

ΙΜΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΙΔΗΡΟΥ ΚΑΙ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΣΤΗΝ  
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ  
ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΑΓΕΛΛΑΙΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

[Επιλογή ημερομηνίας]

ΚΑΛΛΙΡΡΟΗ ΓΙΑΚΟΥΜΠ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Μ. Καψοκεφάλου

Τριμελής Επιτροπή:  
Μ. Καψοκεφάλου  
Μ. Κωμαίτης  
Α. Ζαμπέλας

ΑΘΗΝΑ 2012

### ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κ. Μαρία Καψοκεφάλου για την αμέριστη συμπαράστασή της, για τη σημαντική καθοδήγησή της, καθώς και για τη κατανόηση που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μελέτης μου.

Ευχαριστώ πολύ τα μέλη της τριμελούς επιτροπής καθώς και τον καθηγητή μου κ. Γιαννιώτη για τη στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την υπεύθυνη του εργαστηρίου Μονάδα Διατροφής του Ανθρώπου που πραγματοποίησα το πειραματικό μέρος της διπλωματικής μου μελέτης, Αργύρη Κωνσταντίνα για τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε καθώς και για τη σημαντική της βοήθεια. Επίσης, ευχαριστώ θερμά και τη διδακτορική φοιτήτρια Όλγα Μαλισόβα για τη βοήθειά της.

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και το σύντροφό μου για τη συμπαράστασή τους όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	3
1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΚΑΙ ΣΤΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	3
1.1.1. ΧΗΜΕΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	3
1.1.2. ΣΥΜΒΟΛΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ ΚΑΙ ΟΦΕΛΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ .....	4
1.1.3. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ .....	8
1.1.4. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ .....	9
<b>2. ΣΤΟΧΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ</b> .....	10
2.1. ΣΤΟΧΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ .....	10
2.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ .....	10
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	11
3.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ .....	11
3.1.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ .....	11
3.1.2. ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ.....	12
3.1.3. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ .....	12
3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	13
3.2.1. IN VITRO ΠΕΨΗ.....	13
3.2.2. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΠΗΚΤΗΣ .....	13
3.2.2.1. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΣΤΗΛΗΣ .....	13
3.2.2.2. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ IN VITRO ΠΕΨΗ .....	14

3.2.3. ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FRAP.....	15
3.2.3.1. ΜΕΘΟΔΟΣ FRAP (FERRIC REDUCING ABILITY OF PLASMA)....	15
3.2.3.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ FRAP.....	16
3.2.3.3. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FRAP.....	17
3.2.3.4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FRAP.....	17
3.2.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΤΗ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΣΙΔΗΡΟΥ.....	18
3.2.4.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ ΣΙΔΗΡΟΥ.....	18
3.2.4.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ ΣΙΔΗΡΟΥ .....	18
3.2.5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	18
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	19
4.1. ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FRAP.....	19
4.2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΣΙΔΗΡΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FRAP .....	22
4.3. ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FRAP .....	25
4.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΤΗ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ ΣΙΔΗΡΟΥ .....	28
4.5. ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΠΡΑΣΙΝΟΥ ΤΣΑΓΙΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FRAP.....	31
4.6. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΙΔΗΡΟΥ ΚΑΙ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ .....	32
4.6.1. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΩΑΣΗ 40min ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FRAP .....	32

4.6.1.1. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FRAP .....	33
4.6.1.2. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΣΙΔΗΡΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FRAP ...	37
4.6.1.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FRAP.....	41
4.6.1.4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΣΙΔΗΡΟΥ ΚΑΙ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ .....	45
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	53
5.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΙΔΗΡΟΥ ΚΑΙ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕ ΥΨΗΛΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΙΣΧΥΡΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΣΙΔΗΡΟΥ .....	54
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	55

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### I. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

- Γράφημα 4.1. Αντιοξειδωτική ικανότητα κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος μετά από επώαση 0min, 4min, 15min, 30min και 40min με τη μέθοδο FRAP (Απορρόφηση 595nm)
- Γράφημα 4.2. Αντιοξειδωτική ικανότητα κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος παρουσία Σιδήρου μετά από επώαση 0min, 10min, 30min και 40min με τη μέθοδο FRAP (Απορρόφηση 595nm)
- Γράφημα 4.3. Αντιοξειδωτική ικανότητα κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος παρουσία Ψευδαργύρου μετά από επώαση 0min και 40min με τη μέθοδο FRAP (Απορρόφηση 595nm)
- Γράφημα 4.4. Φασματομετρική απορρόφηση διαλυτού σιδήρου στα 562nm μετά από επώαση τριςθενούς σιδήρου με κλάσματα πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος
- Γράφημα 4.6.1.1. Αντιοξειδωτική ικανότητα κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP (Απορρόφηση 595nm)
- Γράφημα 4.6.1.2. Αντιοξειδωτική ικανότητα κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος παρουσία Σιδήρου μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP (Απορρόφηση 595nm)
- Γράφημα 4.6.1.3. Αντιοξειδωτική ικανότητα κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος παρουσία Ψευδαργύρου μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP (Απορρόφηση 595nm)

### II. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

- Πίνακας 4.1. Απορρόφηση στα 595nm κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος μετά από επώαση 0min, 4min, 15min, 30min και 40min με τη μέθοδο FRAP.
- Πίνακας 4.2. Απορρόφηση στα 595nm κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος παρουσία Σιδήρου μετά από επώαση 0min, 10min, 30min και 40min με τη μέθοδο FRAP.
- Πίνακας 4.3. Απορρόφηση στα 595nm κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος παρουσία Ψευδαργύρου μετά από επώαση 0min και 40min με τη μέθοδο FRAP .
- Πίνακας 4.4. Φασματομετρική απορρόφηση διαλυτού σιδήρου στα 562nm μετά από επώαση τριςθενούς σιδήρου με κλάσματα πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος
- Πίνακας 4.5. Απορρόφηση στα 595nm εκχυλίσματος πράσινου τσαγιού μετά από επώαση 0min και 10min με τη μέθοδο FRAP.
- Πίνακας 4.6.1.1.1. Περιγραφική Ανάλυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας κλασμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

- Πίνακας 4.6.1.1.2. Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κλασμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.
- Πίνακας 4.6.1.1.3. Ανάλυση σημαντικότητας της αντιοξειδωτικής ικανότητας κλασμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.
- Πίνακας 4.6.1.2.1. Περιγραφική Ανάλυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας κλασμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος παρουσία Σιδήρου μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.
- Πίνακας 4.6.1.2.2. Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κλασμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος παρουσία Σιδήρου μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.
- Πίνακας 4.6.1.2.3. Ανάλυση σημαντικότητας της αντιοξειδωτικής ικανότητας κλασμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος παρουσία Σιδήρου μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.
- Πίνακας 4.6.1.3.1. Περιγραφική Ανάλυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας κλασμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος παρουσία Ψευδαργύρου μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.
- Πίνακας 4.6.1.3.2. Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κλασμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος παρουσία Ψευδαργύρου μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.
- Πίνακας 4.6.1.3.3. Ανάλυση σημαντικότητας της αντιοξειδωτικής ικανότητας κλασμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος παρουσία Ψευδαργύρου μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.
- Πίνακας 4.6.1.4.1. Περιγραφική Ανάλυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κλάσματος πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος No7 (χρόνος έκλουσης 22min) μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.
- Πίνακας 4.6.1.4.2. Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κλάσματος πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος No7 (χρόνος έκλουσης 22min) μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.
- Πίνακας 4.6.1.4.3. Περιγραφική Ανάλυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κλάσματος πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος No8 (χρόνος έκλουσης 24min) μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.
- Πίνακας 4.6.1.4.4. Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κλάσματος πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος No8 (χρόνος έκλουσης 24min) μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.
- Πίνακας 4.6.1.4.5. Περιγραφική Ανάλυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κλάσματος πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος No13 (χρόνος έκλουσης 34min) μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.
- Πίνακας 4.6.1.4.6. Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κλάσματος πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος No13 (χρόνος έκλουσης 34min) μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.
- Πίνακας 4.6.1.4.7. Περιγραφική Ανάλυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κλάσματος πεπτιδίων αγελαδινού No20 (χρόνος έκλουσης 48min) μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.
- Πίνακας 4.6.1.4.8. Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κλάσματος πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος No20 (χρόνος έκλουσης 48min) μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.

- Πίνακας 3.6.1.4.9. Συγκεντρωτικός Πίνακας Ανάλυσης Σημαντικότητας της αντιοξειδωτικής ικανότητας κλασμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως υπάρχουν βιοενεργά πεπτίδια γάλακτος με αντιοξειδωτικές ικανότητες. Σε πολλές περιπτώσεις η αντιοξειδωτική ικανότητα των πεπτιδίων γάλακτος απελευθερώνεται μέσω της ενζυμικής υδρόλυσης του γάλακτος. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των πεπτιδικών κλασμάτων γάλακτος φαίνεται πως συνδέεται με τη φύση και τη σύσταση των αποτελούμενων κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος. Μέσα στην ακολουθία διαπιστώνεται πως υπάρχουν και υδρόφοβα αμινοξέα, όπως είναι η τυροσίνη, η προλίνη και η τρυπτοφάνη. Ωστόσο, ο μηχανισμός και οι παράγοντες που συνδέουν την ακολουθία με την αντιοξειδωτική ικανότητα δεν έχουν διερευνηθεί πλήρως.

Στην παρούσα μελέτη διερευνάται η αντιοξειδωτική ικανότητα των κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος που έχει υποστεί ενζυμική υδρόλυση και η επίδραση Σιδήρου και Ψευδαργύρου στην αντιοξειδωτική ικανότητα αυτών. Η αντιοξειδωτική ικανότητα μετρήθηκε μετά από επώαση των δειγμάτων με τη μέθοδο FRAP. Από τα ευρήματα της μελέτης διαπιστώθηκε πως υπάρχουν δυο κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος που διαθέτουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα. Η παρουσία Σιδήρου και Ψευδαργύρου στα πεπτιδικά κλάσματα γάλακτος έδειξε πως επηρέασε την αντιοξειδωτική ικανότητα αυτών.

Στο μέλλον τα βιοενεργά πεπτίδια γάλακτος με αντιοξειδωτικές ιδιότητες θα μπορούν να βρουν εφαρμογή σε βιομηχανική κλίμακα. Ωστόσο απαιτείται περαιτέρω μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος και των συνεργιστικών ή ανταγωνιστικών σχέσεων μεταξύ κλασμάτων πεπτιδίων και άλλων αντιοξειδωτικών συστατικών ή άλλων στοιχείων όπως Σίδηρος και Ψευδάργυρος που πιθανόν να συνυπάρχουν στο τρόφιμο και να επηρεάζουν την υπάρχουσα ιδιότητα.

## ABSTRACT

Recent studies have shown that bioactive milk peptides have antioxidative properties. In many cases, the antioxidant activity of bioactive milk peptides can be released by hydrolysis with digestive enzymes. The activity of these milk peptides is based on their amino acid composition and sequence. In the sequence of bioactive peptides, there are amino acids with high hydrophobicity, for instance proline, tryptophan and tyrosine. Bioactive peptides have been defined as specific protein fragments. However, the structure and activity relationship or the antioxidant mechanism of peptides is not fully understood.

In this study, we examine the antioxidant activity of milk peptides fragments and the influence of Iron and Zinc to this capacity. Bioactive peptides are produced during proteolytic digestion of milk *in vitro*, which resembles the digestion procedure of human's gastrointestinal tract. The antioxidant activity of milk peptides fragments determined after incubation of milk peptides fragments with FRAP method by atomic absorption spectrophotometry. The results showed that two milk peptides fragments have high antioxidant activity. The presence of Iron and Zinc seems to influence the antioxidant capacity of them.

More research is needed to demonstrate which sequence of milk peptides produced during fermentation can have antioxidant activity *in vivo*. Moreover, further research should be carried out about the synergistic and antagonistic effects among amino acids and antioxidative or other compounds such as Zinc or Iron.

Keywords: Antioxidant activity; bioactive milk peptides; Iron; Zinc

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΚΑΙ ΣΤΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

#### 1.1.1. ΧΗΜΕΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Το γάλα περιέχει περίπου 3.3 % πρωτεΐνες και περιλαμβάνει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα [1]. Οι πρωτεΐνες γάλακτος περιέχουν εννιά απαραίτητα αμινοξέα για τον άνθρωπο και συντίθεται στο μαστικό αδένα του ζώου. Το 60% όμως των αμινοξέων που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση των πρωτεϊνών λαμβάνονται από τη διατροφή του ζώου. Το τελικό ποσοστό πρωτεϊνών καθώς επίσης και η σύνθεση των αμινοξέων ποικίλουν ανάλογα με τη ζωοτροφή και τη φυλή του ζώου [3].

Υπάρχουν δυο μεγάλες κατηγορίες πρωτεϊνών γάλακτος οι οποίες διαχωρίζονται από τη χημική τους σύσταση και τις φυσικές τους ιδιότητες [3]. Οι πρωτεΐνες του γάλακτος αποτελούνται από 82% καζεΐνη και 18% πρωτεΐνες ορρού [1]. Η καζεΐνη, είναι μια πρωτεΐνη που περιέχει φώσφορο υψηλής διατροφικής αξίας και η οποία περιέχει όλα τα κοινά αμινοξέα [2]. Οι πρωτεΐνες ορρού δεν περιέχουν φώσφορο και παραμένουν σε διάλυμα σε γάλα σε pH 4,6, ενώ οι καζεΐνες περιέχουν φώσφορο πήζουν σε pH 4,6 [3].

Οι καζεΐνες και οι πρωτεΐνες ορρού υπάρχουν στο γάλα, στο γιαούρτι, στο παγωτό. Σε πολλά τυροκομικά προϊόντα όμως η καζεΐνη μετουσιώνεται για να δώσει το τελικό προϊόν μέσα από τη ζύμωση, ενώ οι πρωτεΐνες ορρού έχουν απομακρυνθεί κατά τη στράγγιση και μόνο μια πολύ μικρή ποσότητα ορρού παραμένει στο τελικό προϊόν [1].

Οι πρωτεΐνες του ορρού αποτελούνται από περίπου 50% β-γαλακτογλοβουλίνη, 20% α-γαλακτογλοβουλίνη, αλβουμίνη ορρού, ανοσογλοβουλίνες, λακτοφερίνη, τρανσφερίνη και άλλες μικρότερες πρωτεΐνες και ένζυμα. Όπως όλα τα βασικά συστατικά του γάλακτος, οι πρωτεΐνες ορρού διαθέτουν τη δική τους χαρακτηριστική δομή και διαφορετικότητα. Όπως προαναφέρθηκε οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος δεν περιέχουν φώσφορο, εξ' ορισμού, αλλά περιέχουν μεγάλη ποσότητα θείου λόγω των αμινοξέων. Λόγω της μορφής των δισουλφιδικών δεσμών εντός της πρωτεΐνης η αλυσίδα της πρωτεΐνης σχηματίζει ένα συμπαγές σφαιρικό σχήμα. Κατά τη μετουσίωση οι δισουλφιδικοί δεσμοί σπάνε, χάνοντας έτσι τη συμπαγή δομή. Στην αρχή της μετουσίωσης βασίζεται και η δημιουργία εξειδικευμένων συστατικών πρωτεΐνης ορού γάλακτος με μοναδικές λειτουργικές ιδιότητες για χρήση στα τρόφιμα. Ένα παράδειγμα είναι η χρήση των πρωτεϊνών ορού γάλακτος προς τη συγκράτηση του νερού στο κρέας και τα αλλαντικά [3].

Η διάσπαση των πρωτεϊνών γίνεται με τη βοήθεια ενζύμων, τα οποία ονομάζονται πρωτεάσες. Η δράση των πρωτεασών μπορεί να είναι επιθυμητή, όπως στην περίπτωση της παρασκευής τυροκομικών προϊόντων και γιαούρτης ή για ερευνητικούς σκοπούς (in vitro πέψη), όπου προστίθεται στο γάλα καλλιέργεια ή ένζυμα με επιθυμητή πρωτεολυτική ιδιότητα. Η πιο σημαντική πρωτεάση για την παρασκευή τυριού είναι η πλασμίνη, διότι προκαλεί πρωτεόλυση κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης η οποία οδηγεί στην επιθυμητή υφή και γεύση στο τυρί [3].

Ανεπιθύμητη υποβάθμιση (πρωτεόλυση) οδηγεί σε γάλα με γεύσεις και κακής ποιότητας. Εκτός των πρωτεολυτικών ενζύμων, η έκθεση στο φως δύναται να υποβαθμίσει τις πρωτεΐνες. Ευαισθησία στο φως παρουσιάζουν δυο αμινοξέα η μεθειονίνη και η κυστεΐνη, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε υποβάθμιση της διατροφικής ποιότητας για αυτά τα δυο αμινοξέα [3].

### 1.1.2. ΣΥΜΒΟΛΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ ΚΑΙ ΟΦΕΛΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

Το γάλα είναι μια εξαιρετικής πηγή ισορροπημένων θρεπτικών στοιχείων. Επίσης διαθέτει ένα μεγάλο εύρος λειτουργικών ιδιοτήτων που επηρεάζουν την πέψη, τις μεταβολικές αντιδράσεις απορρόφησης στοιχείων, την ανάπτυξη και την ανάπτυξη των συγκεκριμένων οργάνων, καθώς και την αντίσταση σε ασθένειες. Αυτές οι ιδιότητες οφείλονται στις περιεχόμενες πρωτεΐνες και στα πεπτίδια του γάλακτος. Οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια ρυθμίζουν τον μεταβολισμό και προωθούν μια διαρθρωτική στήριξη στον οργανισμό. Τα κύτταρα και τα όργανα άλλωστε ελέγχονται από τις ορμόνες που είναι πεπτίδια [2]. Ωστόσο, ορισμένες από τις ιδιότητες αυτές των πρωτεϊνών του γάλακτος «απελευθερώνονται» κατά την ενζυματική υδρόλυση του γάλακτος. Τα βιοενεργά πεπτίδια παράγονται κατά την πέψη του γάλακτος στο γαστρεντερικό σωλήνα, όπως επίσης και κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και της επεξεργασίας των τροφίμων [18].

Βιοδραστικά πεπτίδια έχουν οριστεί συγκεκριμένα κλάσματα πεπτιδίων που έχουν θετική επίδραση σε σημαντικές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού και μπορούν τελικά να επηρεάζουν θετικά την ανθρώπινη υγεία [29]. Τα βιοδραστικά πεπτίδια, μπορεί να επηρεάσουν τα μεγαλύτερα συστήματα του σώματος, δηλαδή, το καρδιαγγειακό, πεπτικό, ανοσοποιητικό και το νευρικό σύστημα. Οι ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία μπορεί να κατηγοριοποιηθούν ως αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντιθρομβωτικές, αντιυπερτασικές, αντιμικροβιακές [19, 20].

Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα σχετικά με την παραγωγή των βιοενεργών πεπτιδίων γάλακτος έχει αυξηθεί σε μεγάλο βαθμό. Μεμονωμένες πρωτεΐνες, καζεΐνες από γάλα έχουν χρησιμοποιηθεί ως πηγή πρωτεΐνης για να μελετηθεί η δράση των πεπτιδίων με διάφορες εφαρμογές [29]. Ωστόσο, υπάρχει περιορισμένη διαθέσιμη πληροφορία σχετικά με την ακολουθία των αμινοξέων των πεπτιδίων που συμβάλλουν στην βελτίωση των λειτουργικών αυτών χαρακτηριστικών [30].

Οι ιδιότητες των βιοενεργών πεπτιδίων με βάση τα αποτελέσματα ερευνών μπορούν να καταταχθούν στην ομάδα εκείνων των συστατικών που προστίθενται στα τρόφιμα για τις λειτουργικές τους ιδιότητες [29].

Οι πρωτεΐνες γάλακτος αποτελούνται από τις β-λακτογλοβουλίνη, α-λακταλβουμίνη, ανοσογλοβουλίνες, γλυκομακροπεπτιδία, αλβουμίνες ορρού και μικρότερες πρωτεΐνες, όπως λακτοπεριοξυδάση, λυσοζύμη και λακτοφερίνη. Κάθε ένα από αυτά τα κλάσματα που προέρχονται είτε από τις καζεΐνες είτε από τις πρωτεΐνες ορρού διαθέτουν κάποιες λειτουργικές ιδιότητες, με αποτέλεσμα να υπάρχουν ορισμένα βιοενεργά πεπτίδια [18].

Βιοενεργά πεπτίδια έχουν εντοπιστεί σε ακολουθία αμινοξέων πρωτεϊνών γάλακτος και απελευθερώνονται κατά τις αντιδράσεις υδρόλυσης πρωτεϊνών, κυρίως ενζυματικής υδρόλυσης. Αυτά τα βιοενεργά πεπτίδια είναι δυνατόν να επηρεάζουν άμεσα πολλές βιολογικές διεργασίες (γαστρεντερικές, ανοσολογικές, νευρολογικές, διατροφικές). Επιπλέον, τα πεπτίδια που προέρχονται από πρωτεΐνη γάλακτος έχει αποδειχθεί ότι ασκούν επίδραση στο πεπτικό σύστημα και στις μεταβολικές λειτουργίες του οργανισμού. Επίσης, έρευνες έδειξαν ότι μπορούν να επηρεάσουν και το ανοσοποιητικό σύστημα [30]. Οι πρωτεΐνες του ορρού περιέχουν ανοσογλοβουλίνες, οι οποίες είναι σημαντικές για το ανοσοποιητικό σύστημα [1].

Αυτού του είδους οι ιδιότητες μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη τροφίμων τα οποία περιορίζουν ή εξαλείφουν ασθένειες [30]. Οι συγκεκριμένες επιδράσεις των πεπτιδίων για κάθε κατηγορία έχουν διερευνηθεί. Ωστόσο, είναι σημαντικό να διερευνηθεί περαιτέρω η επίδραση τους στην ανθρώπινη υγεία [28].

Μερικά από τα πεπτίδια των πρωτεϊνών του γάλακτος είναι ικανά να επηρεάσουν κάποιες βιολογικές λειτουργίες του οργανισμού. Αυτή η επίδραση μπορεί να είναι αντιμικροβιακή και προβιοτική, δηλαδή, εμποδίζει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των ανεπιθύμητων και παθογόνων οργανισμών, ή που μπορεί να προωθήσει την ανάπτυξη των επιθυμητών βακτηρίων στο πεπτικό σύστημα των ανθρώπων και των ζώων [30]. Πολλές εφαρμογές έχουν ήδη εξελιχθεί. Για παράδειγμα, τα φωσφοπεπτίδια που προέρχονται από κλάσματα καζεΐνης χρησιμοποιούνται σήμερα τόσο ως συμπληρώματα διατροφής όσο και ως συστατικά φαρμάκων [28].

Δυνητικά, η προσθήκη βιοενεργών πεπτιδίων σε τρόφιμα θα μπορούσε να βελτιώσει την ασφάλεια τους, λόγω των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους. Τέλος, τα βιοενεργά πεπτίδια μπορούν να λειτουργήσουν ως προϊόντα υγείας, παρέχοντας θεραπευτική ιδιότητες είτε για τη θεραπεία κάποιας λοίμωξης είτε για την πρόληψη της νόσου [28]. Οι πρωτεΐνες του ορρού περιέχουν διακλαδισμένη αλυσίδα αμινοξέων (λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη) και έχουν προταθεί για να έχουν κάποια οφέλη για τους αθλητές για την αποκατάσταση των μυών και για την πρόληψη της ψυχικής κόπωσης [1]. Τα πεπτίδια που μπορούν να παραληφθούν από την ενζυματική πρωτεόλυση των πρωτεϊνών των τροφών, μπορούν να δράσουν ως ενδυνάμει ρυθμιστές μεταβολισμού κατά την διάρκεια της εντερικής πέψης της τροφής [4].

Η πιθανή ρυθμιστική ιδιότητα που παρέχουν τα πεπτίδια σχετίζεται με τη διατροφική πρόσληψη και την άμυνα του ανοσοποιητικού συστήματος [4].

Τα ολιγοπεπτίδια που προκύπτουν από πρωτεΐνες των τροφίμων και ειδικά των πρωτεϊνών αγελαδινού γάλακτος είναι γνωστό ότι έχουν βιοενεργή δράση [6] και κάποια από αυτά έχουν και αντιυπερτασικές ιδιότητες [5].

Τα πεπτίδια γάλακτος, ειδικά οι καζεΐνες αποτελούν μια σημαντική πηγή βιοενεργών πεπτιδίων. Κατά τις πρόσφατες μελέτες, οι μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεΐνες γάλακτος, όπως η α-λακτοαλβουμίνη και β-λακτογλοβουλίνη, έδειξαν ότι περιέχουν βιονενεργά πεπτίδια κατά την *in vitro* υδρόλυση πρωτεϊνών αγελαδινού γάλακτος. Πεπτίδια με παρεμποδιστική δράση στην μετατροπή του ενζύμου της αγγιοτενσίνης ACE βρέθηκε στις α- και β- λακτογλοβουλίνες . Έρευνα έδειξε πως ορισμένα πεπτίδια παρουσίασαν μια παρεμποδιστική δράση του ACE. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως υπήρχαν αρκετά βιονενεργά πεπτίδια τα οποία προέκυψαν από ενζυματική υδρόλυση και τα οποία θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην βελτίωση τροφίμων με ειδικών κατηγοριών (υπερτρόφιμα, τρόφιμα για την αντιμετώπιση της υπέρτασης) [4].

Άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε υδρολυμένες πρωτεΐνες γάλακτος έδειξε παρόμοια αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκαν βιονενεργά πεπτίδια γάλακτος με παρεμποδιστική δράση στην μετατροπή του ενζύμου της αγγιοτενσίνης ACE έπειτα από ενζυμική πέψη του αγελαδινού γάλακτος. Κατά την απομόνωση των κλασμάτων πεπτιδίων που προέκυψαν μέσω της χρωματογραφίας, έδειξαν ότι παρεμποδιστικές ιδιότητες είχαν τα κλάσματα α-λακτοαλβουμίνης (50±52), (99±108) και (104±108) και β-λακτογλοβουλίνης (22±25), (32±40), (81±83), (94±100), (106±111) και (142±146) [5].

Σε άλλες μελέτες έχουν αναφερθεί μερικά ενδογενώς και προερχόμενα από τρόφιμα πεπτίδια γάλακτος τα οποία παρεμποδίζουν την μετατροπή του ενζύμου της αγγιοτενσίνης ACE [7], συμπεριλαμβανομένων και των πεπτιδίων που προέρχονται από την καζεΐνη [8,9,10,11,12]. Παρόμοια αποτελέσματα με τις προαναφερθείσες έρευνες έδειξαν και κάποιες πρόσφατες μελέτες. Σε αυτές προσδιορίστηκαν πεπτίδια με παρεμποδιστική δράση ACE τα οποία προέρχονται από πρωτεΐνες γάλακτος [13, 14]. Κάποια από αυτά τα πεπτίδια παρουσίασαν πολλαπλές ιδιότητες, όπως τα πεπτίδια β- καζομορφίνη και λακτορφίνες (b-casomorphin and lactorphins), τα οποία παρουσίασαν εκτός της παρεμποδιστικής δράσης ACE και θετική επίδραση στο νευρικό σύστημα [15, 16,17].

Το ενδιαφέρον σε αυτά τα πεπτίδια και στις έρευνες που βασίζονται πάνω στις ιδιότητες τους είναι να παρουσιαστούν πεπτίδια με διάφορα μοριακά μεγέθη τα οποία θα έχουν διάφορες λειτουργικές ιδιότητες τις οποίες και θα προσδίδουν στα τρόφιμα στα οποία θα προστίθενται.

Η επίδραση βιονενεργών πεπτιδίων στο ανοσοποιητικό σύστημα είναι αντικείμενο έρευνας, αλλά παρόλο που οι μελέτες που έχουν γίνει μέχρι στιγμής και αφορούν την επίδραση των πεπτιδίων στο ανοσοποιητικό σύστημα είναι σχετικά πρόσφατες, έχουν σημαντικό ενδιαφέρον για περαιτέρω διερεύνηση. Η επίδραση των βιονενεργών πεπτιδίων προσδιορίζεται μέσα από μια προσομοίωση του ανοσοποιητικού συστήματος και της αντιμικροβιακής επίδρασης των πεπτιδίων. Έτσι μερικά πεπτίδια παρουσίασαν μια θετική επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα [18].

Επίσης, έχει προταθεί ότι ορισμένα πεπτίδια του γάλακτος μπορεί να αποτρέπουν αλλεργικές αντιδράσεις στους ανθρώπους και να ενισχύουν την ανοσία στον γαστρεντερικό σωλήνα [23].

Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του γάλακτος έχουν αναγνωρισθεί εδώ και πολλά χρόνια. Η εν λόγω ιδιότητα προέρχεται από τις υπάρχουσες ανοσογλοβουλίνες και τις άλλες πρωτεΐνες, όπως η λακτοφερίνη, λυσοζύμη, λακτοπεροξειδάση. Ένα από τα πιο ισχυρά αντιμικροβιακά πεπτίδια που περιγράφονται μέχρι στιγμής αντιστοιχεί σε κλάσμα πρωτεΐνης ορού λακτοφερίνης, που ονομάζεται λακτοφερίνη [25].

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν επίσης πως ορισμένα πεπτίδια παρουσιάζουν έναν ενεργό ρόλο στο νευρικό σύστημα. Αυτά τα πεπτίδια είναι γνωστά ως “οριοΐδ peptides”. Τα πρώτα σημαντικά πεπτίδια με τις εν λόγω ιδιότητες ήταν κλάσματα β-καζεινης, οι λεγόμενες β-καζομορφίνες (*β-casomorphins*) [26].

Υποχοληστερολεμικά πεπτίδια (Ile-Ile-Ala-Glu-Lys) διαπιστώθηκαν από την πρωτοταγή υδρόλυση της β-λακτογλοβουλίνης [26]. Αυτό τα πεπτίδια κατέστειλαν την απορρόφηση χοληστερόλης μέσω των Caco-2 cells *in vitro* και προκάλεσε υποχοληστερολαιμική δραστηριότητα *in vivo* σε αρουραίους. Ωστόσο ο μηχανισμός χρειάζεται να αποσαφηνιστεί.

Ένα άλλο παράδειγμα της πολυλειτουργικότητας των πεπτιδίων γάλακτος είναι και τα κλάσματα α<sub>s1</sub>-καζεινης (194-199) που παρουσιάζουν ανοσοποιητική και ACE-ανασταλτική δραστηριότητα. Τα πεπτίδια α- και β-λακτορφίνες εκτός της ACE-ανασταλτικής δράσης παρουσιάζουν επίσης και ανοσοποιητικές ιδιότητες λόγω της δράσης του ασβεστίου και των δεσμευτικών φωσφοπεπτιδίων που έχουν τα εν λόγω πεπτίδια [24].

Οι ιδιότητες αυτών των βιολειτουργικών πεπτιδίων βασίζεται στο είδος των αμινοξέων και στη μεταξύ τους ακολουθία. Το μέγεθος της δράσης των πεπτιδίων μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τον αριθμό και την ακολουθία των αμινοξέων [21], όπως τα πεπτίδια από την ακολουθία 60-70 της β-καζεΐνη που διαθέτουν ανοσοδιεγερτικές ιδιότητες, παρεμποδιστική δράση του ενζύμου της αγγειοτενσίνης (ACE) [22,23]. Αυτή η ακολουθία προστατεύεται από την πρωτεολυτική δράση των ενζύμων λόγω της υψηλής υδροφοβικότητας και της παρουσίας των υπολειμμάτων προλίνης.

### 1.1.3. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Μια άλλη λειτουργική ιδιότητα που μελετάται σε πρόσφατες μελέτες, είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως υπάρχουν πεπτίδια τα οποία έχουν αντιοξειδωτικές ικανότητες, οι οποίες προέρχονται από τις καζεΐνες και απελευθερώνονται μέσω της ενζυματικής υδρόλυσης [20]. Πολλές από αυτές τις ιδιότητες προέρχονται από την  $\alpha_s$ - καζεΐνη, η οποία έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει αντιοξειδωτικές ιδιότητες και ότι παρεμποδίζει την ενζυματική και τη μη-ενζυματική οξείδωση των λιπιδίων [20].

Η ικανότητα των πρωτεϊνών φυτικής (π.χ. σόγια) ή ζωικής προέλευσης (π.χ. γάλα) που έχουν υποστεί υδρόλυση να παρεμποδίζουν τις επιβλαβείς συνέπειες μιας οξείδωσης φαίνεται πως συνδέεται με τη φύση και τη σύσταση των αποτελούμενων των κλασμάτων πεπτιδίων. Για παράδειγμα, η αντιοξειδωτική ικανότητα υδρολυμένης πρωτεΐνης σόγιας αποδόθηκε στην αλληλουχία πεπτιδίων που περιέχουν Leu- Leu-Pro-His-His [34,35]. Διάφορα αμινοξέα, για παράδειγμα τυροσίνη, μεθειονίνη, ιστιδίνη, τρυπτοφάνη και προλίνη έχουν δείξει ότι έχουν αντιοξειδωτική ικανότητα, ενώ σε ειδικές συνθήκες (π.χ. υψηλές συγκεντρώσεις) δύναται να δράσουν και ως πρόδρομες αντιοξειδωτικές ουσίες [41,42].

Το γάλα διαθέτει αρκετά αντιοξειδωτικά στοιχεία, όπως οι βιταμίνες και τα ένζυμα. Ωστόσο, έχει διευρυνθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα και των πρωτεϊνών γαλακτός όπως και των κλασμάτων πεπτιδίων γαλακτός που προκύπτουν μετά από την υδρόλυση των πρωτεϊνών [38]. Τα πεπτίδια με την αντιοξειδωτική δράση φαίνεται να αποτελούνται από 5 έως 11 αμινοξέα. Μέσα στην ακολουθία διαπιστώνεται πως υπάρχουν και υδρόφοβα αμινοξέα, όπως είναι η προλίνη, η τυροσίνη και τρυπτοφάνη. Ο μηχανισμός και οι παράγοντες που συνδέουν την ακολουθία με την αντιοξειδωτική ικανότητα δεν έχουν διερευνηθεί αναλυτικά [38].

Σε έρευνα που βασίστηκε στη μελέτη της επίδρασης των αμινοξέων στην αντιοξειδωτική ικανότητα των πεπτιδίων γαλακτός, διαπιστώθηκε πως υπήρχε αντιοξειδωτική ικανότητα στα κλάσματα πεπτιδίων γαλακτός που είχε υποστεί υδρόλυση. Τα κλάσματα με μοριακό βάρος μεγαλύτερα των (>45 kDa) διαπιστώθηκε ότι είχαν υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα (24–27%), όταν μετρήθηκαν με χαμηλότερου μοριακού βάρους κλάσματα. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των πεπτιδίων γαλακτός βρέθηκε να συσχετίζεται με την παρουσία υδρόφοβων αμινοξέων και της ιστιδίνης [31].

Η συσχέτιση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με το μοριακό βάρος των κλασμάτων πεπτιδίων διαπιστώθηκε και σε πρόσφατες μελέτες [8,9, 32,33] όπου ελέγχθηκε κατά πόσο οι υψηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνες γαλακτός διαθέτουν αντιοξειδωτική ικανότητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι υψηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνες ήταν πιο αποτελεσματικές απ' ότι οι χαμηλού μοριακού τύπου στην παρεμπόδιση της οξείδωσης λιπιδίων και κατ' επέκταση είχαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Ελεύθερα αμινοξέα, όπως η τυροσίνη, η μεθειονίνη, ιστιδίνη, λυσίνη, τρυπτοφάνη και προλίνη έχουν επίσης τη δυνατότητα να καθυστερούν την οξείδωση και να δρουν ως αντιοξειδωτικοί παράγοντες, ενώ σε ειδικές συνθήκες, όπως υψηλές συγκεντρώσεις μπορούν να δράσουν ως προ- οξειδωτικά συστατικά [36,37].



Σε μελέτη που έγινε για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας πεπτιδίων γάλακτος που είχαν υποστεί ενζυματική υδρόλυση και είχαν διαχωριστεί σε χρωματογραφία διήθησης πηκτής, έδειξε πως από τα τέσσερα κλάσματα πεπτιδίων που διαχωρίστηκαν (κλάσμα I.  $>40k$ , κλάσμα II.  $2.8-40k$ , κλάσμα III.  $0.1-2.8k$  και κλάσμα IV.  $<0.1k$ ) το τρίτο κλάσμα πεπτιδίων παρουσίασε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Συνεπώς, η αντιοξειδωτική ικανότητα πεπτιδίων γάλακτος που έχουν υποστεί ενζυματική υδρόλυση, εξαρτάται από το μοριακό βάρος των πεπτιδίων και με πιο σημαντικό το μέγεθος των  $0.1-2.8k$  που παρουσιάζουν την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα [39].

Στο μέλλον, τα πεπτιδία με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες μπορούν να βρουν εφαρμογή ως συστατικά σε διάφορα πεδία, όπως για την παρεμπόδιση της οξειδωσης των λιπαρών τροφών, στα καλλυντικά και στα φαρμακευτικά. Ωστόσο, περισσότερη έρευνα οφείλει να γίνει προκειμένου να διαπιστωθεί εάν τα πεπτιδία που απελευθερώνονται κατά την ενζυματική υδρόλυση μπορεί να παρεμποδίσουν την οξείδωση *in vivo*.

#### 1.1.4. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Οι πρωτεΐνες ορρού γάλακτος αποτελούν από τα πιο σημαντικά συστατικά τροφίμων τόσο για τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες ως πρόσθετα όσο και για τα διατροφικά τους οφέλη [1]. Όπως λόγω χάρη, η χρήση των πρωτεϊνών ορρού σε υψηλής πρωτεϊνικής πηγής ενεργειακά ποτά και μπάρες προσανατολισμένα για αθλητές. Η χρήση τους για τη διατήρηση της υγρασίας σε προϊόντα κρέατος και αλλαντικά, καθώς και σε προϊόντα αρτοποιίας. Επίσης προσδίδουν παρόμοιες ιδιότητες με τις πρωτεΐνες του αυγού [1].

Υπάρχουν μελέτες που ασχολήθηκαν με τη βελτίωση των λειτουργικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνών που έχουν υδρολυθεί ενζυματικά, όπως βελτίωση της διαλυτότητας και της ζελατινοποίησης [30]. Τα γευστικά χαρακτηριστικά των πεπτιδίων που λαμβάνονται από πρωτεΐνες γάλακτος έχουν εξεταστεί και έχει διαπιστωθεί πως η πικρή γεύση των πεπτιδίων είναι σύνηθες φαινόμενο. Πολλά πεπτιδία που παρουσιάζουν αυξημένες λειτουργικές ιδιότητες και βιοενεργή δράση είναι πιθανό να είναι πικρά [30].

Έχουν γίνει αρκετές έρευνες που βασίζονται στο σχεδιασμό και στην εφαρμογή εξειδικευμένου εξοπλισμού για βιομηχανική παραγωγή και απομόνωση πεπτιδίων γάλακτος. Παρ' όλα αυτά δεν είναι επαρκής για την παραγωγή τους σε βιομηχανική κλίμακα [29].

## 2. ΣΤΟΧΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

### 2.1 ΣΤΟΧΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στόχοι αυτής της πειραματικής ενότητας είναι η μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των πεπτιδίων γάλακτος που έχουν υποστεί ενζυμική υδρόλυση και η μελέτη της επίδρασης Σιδήρου και Ψευδαργύρου στην υπάρχουσα αντιοξειδωτική ικανότητα αυτών.

### 2.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Ο πειραματικός σχεδιασμός περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- α) *In vitro* πέψη αγελαδινού γάλακτος, παρουσία ενζύμων
- β) Διαχωρισμός κλάσματος πεπτιδίων που προκύπτει από την *in vitro* πέψης του αγελαδινού γάλακτος με χρωματογραφία διήθησης πηκτής. Το υλικό πλήρωσης στήλης είναι η ρητίνη Sephadex G-25, με όρια κλασμάτωσης μοριακών βαρών 1000-5000.
- γ) Μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των πεπτιδικών κλασμάτων με τη μέθοδο Frap.
- δ) Επίδραση του Ψευδαργύρου και Σιδήρου στην υπάρχουσα αντιοξειδωτική ικανότητα των πεπτιδικών κλασμάτων.
- ε) Μελέτη της επίδρασης των πεπτιδικών κλασμάτων που απομονώνονται με τη χρωματογραφία διήθηση πηκτής στη διαλυτότητα του σιδήρου

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Όλα τα υαλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία, πλύθηκαν με νερό ύδρευσης και στη συνέχεια με απιονισμένο νερό. Επιπλέον των παραπάνω, τα υαλικά που χρησιμοποιούνταν στη μέτρηση της διαλυτότητας του σιδήρου βυθίζονταν σε 1 N HCl για τουλάχιστον 4 h και ακολούθως ξεπλένονταν με απεσταγμένο νερό ώστε να απομακρυνθούν οι πιθανές επιμολύνσεις που μέταλλα. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα προέρχονταν από την επιχείρηση Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany).

##### 3.1.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ:

- **Γάλα:** Γάλα αγελάδος 0% λιπαρά (εταιρία ΜΕΒΓΑΛ). Το pH ρυθμίζεται σε 2.8 με 6 N και 1N HCl
- **Πεψίνη:** Πεψίνη, 4 g σε 100 ml 0.1 M HCl.
- **Παγκρεατίνη και χολικά άλατα:** Παγκρεατίνη και εκχύλισμα χολικών αλάτων χοίρου, 2 και 12 g αντίστοιχα σε 100 ml 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>
- **PIPES:** Πιπεράζινο-1,4-δισ(2-αιθανοσουλφονικό οξύ) δινάτριο άλας 0.15 M. Το pH ρυθμίζεται με 6 M HCl στη τιμή που απαιτείται από το πρωτόκολλο. εξω
- **Βόεια αλβουμίνη ορού (BSA):** Γίνεται ανασύσταση με διάλυση σε 0.075 M PIPES pH 5.7, σύμφωνα με τις οδηγίες και με κατάλληλες αραιώσεις παρασκευάζονται διαλύματα συγκεντρώσεων 1, 0.8, 0.4, 0.2, και 0.1 mg/mL των οποίων μετράται η απορρόφηση στα 280 nm για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς.
- **Σίδηρος:** Τριχλωριούχος σίδηρος, 10 ppm σε 0.01 M HCl.
- **Ψευδάργυρος:** χλωριούχος ψευδάργυρος, 10 ppm σε 0.01 M HCl.
- **PIPES:** Πιπεράζινο-N,N'-δισ (2-αιθανοσουλφονικό οξύ) δινάτριο άλας, 0.075 M. Το pH ρυθμίζεται σε 5.7 με 6 N HCl.
- **Υδροχλωρική υδροξυλαμίνη:** 2.5 g υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) σε 50 ml H<sub>2</sub>O
- **Φερροζίνη.** Δινάτριο άλας της 3-(2-πυριδιλο)-5,6-δισ (4 φαινυλοσουλφονικό οξύ)-1,2,4-τριαζίνης, 5 mg/ml σε H<sub>2</sub>O
- **Οξικό Νάτριο** (CH<sub>3</sub>COONa)
- **Υδροχλωρικό οξύ** (HCl)
- **Διάλυμα Οξικού Οξέος** 0.3M (CH<sub>3</sub>COOH)
- **Διάλυμα TPTZ** 10Mm (2,4,6-Tri(2-Pirydil)-s-triazine) σε HCl 40mM
- **Διάλυμα ένυδρου τριχλωριούχου σιδήρου** (FeCl<sub>3</sub>\*6H<sub>2</sub>O) 20Mm σε HCl 40mM
- **Πράσινο τσάι** (Green tea της εταιρίας Lipton)

### 3.1.2. ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ:

- Αναλυτικός ζυγός
- Ηλεκτρονική πιπέτα 10-1000μl
- Πιπέτα 10-1000μl
- Θερμοστατούμενο υδατόλουτρο συνεχούς ανακίνησης
- Φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους Jasco V-530
- pH-μετρου (UltraBasic, Denver Instrument, Denver, Colorado)
- Περισταλτικής αντλίας (EP-1 Econo Pump, Bio-Rad Laboratories)
- Κλασματοσυλλέκτης (Bio-Rad)
- Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους/ορατού διπλής δέσμης (JASCO V-530)

### 3.1.3. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Πριν τη διεξαγωγή της μεθόδου FRAP για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε προετοιμασία στο δείγμα του πράσινου τσαγιού, το οποίο αποτέλεσε για τη διπλωματική μελέτη δείκτης ισχυρού αντιοξειδωτικού. Η προετοιμασία του πράσινου τσαγιού περιελάμβανε την εκχύλιση με ζεστό νερό, το οποίο παραλήφθηκε έπειτα από βράσιμο του νερού σε ποτήρι ζέσεως. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν 2g πράσινο τσάι (εντός διηθητικού υλικού) σε 100ml ζεστού νερού για 5min με ελαφριά ανάδευση, προκειμένου να παραληφθεί το εκχύλισμα. Έπειτα ακολούθησε αραίωση του δείγματος 1:100.

## **3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **3.2.1 IN VITRO ΠΕΨΗ**

Για την *in vitro* πέψης του αγελαδινού γάλακτος εφαρμόζεται η μεθοδολογία που περιγράφεται από τους Kapsokefalou & Miller (1991) [43]. Σε δείγμα 10 ml αγελαδινού γάλακτος με 0% λιπαρά, ρυθμίζεται το pH σε 2.8 με 6 N και 1 N HCl και ακολούθως προστίθεται 0.5 ml διαλύματος πεψίνης. Το pH μετράται με τη βοήθεια pH-μετρου. Το δείγμα τοποθετείται σε θερμοστατούμενο υδατόλουτρο συνεχούς ανακίνησης και επωάζεται για 2 ώρες στους 37 °C. Μετά το πέρας των 2 ωρών το pH του δείγματος ρυθμίζεται σε 5.7 με 5 M NaOH και στη συνέχεια προστίθενται 2.5 ml αιωρήματος παγκρεατίνης και χολικών αλάτων. Το δείγμα τοποθετείται ξανά στο υδατόλουτρο όπου παραμένει για άλλες 2 ώρες, οπότε και ολοκληρώνεται η πέψη. Μετά το τέλος της πέψης το δείγμα τοποθετείται σε φυγοκεντρικούς σωλήνες τύπου erpendorf των 1ml και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 min στα 12000 g. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης γίνεται διαχωρισμός του υπερκείμενου διαλύματος σε κλάσματα 1 ml σε φυγοκεντρικούς σωλήνες τύπου erpendorf οι οποίοι τοποθετούνται στην κατάψυξη στους -18°C, μέχρι τον χρωματογραφικό διαχωρισμό.

### **3.2.2. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΠΗΚΤΗΣ**

Ο διαχωρισμός του προϊόντος σε κλάσματα πεπτιδίων που προκύπτει από την *in vitro* πέψης του αγελαδινού γάλακτος πραγματοποιείται με χρωματογραφία διήθησης πηκτής. Το υλικό πλήρωσης στήλης είναι η ρητίνη Sephadex G-25, με όρια κλασμάτωσης μοριακών βαρών 1000-5000.

#### **3.2.2.1. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΣΤΗΛΗΣ**

Για την προετοιμασία της στήλης χρησιμοποιήθηκαν 5g ρητίνη Sephadex G-25 τα οποία διογκώθηκαν για 4 ώρες σε ρυθμιστικό διάλυμα PIPES 0.075 M, pH 5.7 σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη διόγκωση, η περίσσεια του ρυθμιστικού διαλύματος απορρίπτεται και η ρητίνη συνέχεια μεταφέρεται στη στήλη χρωματογραφίας στήλη διαμέτρου 1 cm και μήκους 29 cm με τη βοήθεια κατάλληλου χωνιού. Ακολούθως και με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας εκλούεται ρυθμιστικό διάλυμα PIPES 0.075 M, pH 5.7. Για την πλήρωση της στήλης αφήνονται να περάσουν από τη στήλη δυο όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος (τουλάχιστον 40ml) με ρυθμό 1 ml/min. Για τη διεξαγωγή του πειράματος και για το διαχωρισμό του δείγματος η ροή ρυθμίζεται σε 0.5 ml/min.

### **3.2.2.2. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ IN VITRO ΠΕΨΗ**

Για το διαχωρισμό του δείγματος ακολουθείται η εξής διαδικασία. Αρχικά σταματάει η λειτουργία της περισταλτικής αντλίας και αφαιρείται το εξάρτημα που καλύπτει το πάνω μέρος της στήλης που συνδέεται με την αντλία, προκειμένου να απομακρυνθεί το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα από το πάνω μέρος της στήλης. Στη συνέχεια, προστίθενται 0,25 ml δείγματος γάλακτος μετά την in vitro πέψη, στο πάνω μέρος της στήλης. Αφού, εισχωρήσει όλο το δείγμα στο εσωτερικό της ρητίνης, προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα 0.075 M PIPES, pH 5.7 στην επιφάνειά της τόσο όσο είχε αφαιρεθεί και κλείνεται ξανά η επάνω επιφάνεια με το εξάρτημα της στήλης. Ακολούθως ανοίγεται η αντλία προκειμένου να διαπεράσει τη στήλη ρυθμιστικό διάλυμα PIPES, με ρυθμό 1 ml/min. Η συλλογή των κλασμάτων πεπτιδίων ξεκινάει στα 10 min και αφού έχει εκλουσθεί ο κενός όγκος της στήλης (ο κενός όγκος υπολογίζεται ότι είναι 15 ml). Τα κλάσματα όγκου 1ml συλλέγονται ανά 2 λεπτά σε κλασματοσυλλέκτη.

### **3.2.3. ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΑΓΕΛΛΑΙΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FRAP**

#### **3.2.3.1. ΜΕΘΟΔΟΣ FRAP (FERRIC REDUCING ABILITY OF PLASMA)**

Στόχος αυτού του πειραματικού σταδίου είναι η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των πεπτιδίων γάλακτος που έχουν απομονωθεί με τη χρωματογραφία διήθησης πηκτής (Sephadex G-25), με βάση τη μέθοδο FRAP Benzie & Strain, 1996 [45].

Η μέθοδος σχεδιάστηκε το 1996 από τους Benzie & Strain με σκοπό τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος ως ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC, Total Antioxidant Capacity). Ωστόσο, η εν λόγω μέθοδος δεν χρησιμοποιείται πια μόνο για τη μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας σε βιολογικά υγρά in vivo, αλλά και για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε τρόφιμα ή φυτά in vitro.

Η μέθοδος FRAP βασίζεται στην αντίδραση αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου που βρίσκεται συμπλοκοποιημένο με τη TPTZ σε δισθενή σίδηρο παρουσία αντιοξειδωτικού, εν προκειμένω τα κλάσματα πεπτιδίων, σε pH 3,6 και σε θερμοκρασία 37°C και σε μήκος κύματος 595nm. Το άχρωμο σύμπλοκο μετατρέπεται σε χρωματισμένη ένωση δισθενούς σιδήρου με TPTZ. Η αναγωγική δύναμη του δείγματος μετράται από την τιμή της απορρόφησης σε φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους διπλής δέσμης (JASCO V-530) στα 595nm. Η τιμή της απορρόφησης είναι ανάλογη με την αντιοξειδωτική ικανότητα των πεπτιδίων, τα οποία ανάγουν τον σίδηρο από τρισθενή σε δισθενή [45].

### 3.2.3.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ FRAP

#### 1. Ρυθμιστικό Διάλυμα Οξικού Οξέος 0.3M

Για την παρασκευή 1000ml ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος 0.3M χρησιμοποιήθηκαν 3,1g Οξικό Νάτριο (MB=136,08), 16ml Οξικού Οξέος και υπερκάθαρο νερό. Το PH του διαλύματος ρυθμιζόταν στα 3,6.

#### 2. Διαλύμα TPTZ 10mM σε HCl 40 mM

Για την παρασκευή 10ml διαλύματος TPTZ 10mM χρησιμοποιήθηκαν 0,031g TPTZ σε 10ml διαλύματος HCl 40mM.

#### 3. Διάλυμα $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20mM σε HCl 40 mM

Για την παρασκευή 10ml διαλύματος ένυδρου τριχλωριούχου σιδήρου ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 20mM, χρησιμοποιήθηκαν 0,054g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  σε 10ml, διαλύματος HCl 40mM.

#### 4. Αντιδραστήριο FRAP

Το αντιδραστήριο FRAP παρασκευάζεται από την ανάμειξη 40ml ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος 0.3M σε PH 3,6, 4ml διαλύματος TPTZ 10mM και 4ml διαλύματος τριχλωριούχου σιδήρου ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 20mM. Η αναλογία των τριών διαλυμάτων είναι 10:1:1 αντίστοιχα. Στη συνέχεια το αντιδραστήριο τοποθετείται στο υδατόλουτρο στους 37°C.



### **3.2.3.3. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FRAP**

Μετά την *in vitro* πέψη του γάλακτος και το χρωματογραφικό διαχωρισμό του, όπως περιγράφονται στις παραγράφους 3.2.1. και 3.2.2. αντίστοιχα, ακολουθεί η προετοιμασία των δειγμάτων για την πειραματική πορεία της μεθόδου FRAP.

Στο πειραματικό στάδιο κατά το οποίο μετράται η αντιοξειδωτική ικανότητα των κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος παρουσία Σιδήρου και Ψευδαργύρου, προστέθηκαν 60μl διαλύματος 10 ppm  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  σε 30μl κλάσματος πεπτιδίων και αφέθηκε το περιεχόμενο του δείγματος προς επώαση για 15 min, αφού πρώτα υπέστη ελαφριά περιδίνηση. Ενώ στην περίπτωση του Ψευδαργύρου προστέθηκαν σε 0,7ml κλάσματος πεπτιδίων 0,8 ml διαλύματος Ψευδαργύρου 10ppm. Στη συνέχεια και αφού επώαστηκε το δείγμα για 15min χρησιμοποιήθηκαν 30μl τελικού δείγματος για τη μέθοδο Frap.

Στη συνέχεια, για την έναρξη της αναγωγικής αντίδρασης και την μέτρηση της απορρόφησης στα 595nm, τοποθετούνται σε κυψελίδες plate 30μl κλάσματος πεπτιδίων γάλακτος και 300μl διάλυματος Frap τα οποία είχαν ήδη θερμανθεί σε υδατόλουτρο στους 37°C.

Στο πειραματικό στάδιο κατά το οποίο μετράται η αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλίσματος πράσινου τσαγιού που έχει παρασκευαστεί σύμφωνα με την παράγραφο 3.1.3., χρησιμοποιήθηκαν 30μl εκχυλίσματος πράσινου τσαγιού και 300μl διαλύματος Frap.

### **3.2.3.4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FRAP**

Έπειτα από την προσθήκη του αντιδραστήριου FRAP στα δείγματα, μετράται η απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους διπλής δέσμης (JASCO V-530) στα 595nm και στους 37°C στιγμιαία και έπειτα από επώαση των δειγμάτων με το αντιδραστήριο FRAP 10min, 30min και 40min. Η μέτρηση λαμβάνεται σε δυο σειρές δειγμάτων (duplicate) για κάθε κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε πίνακες στους οποίους φαίνονται οι απορροφήσεις στους αντίστοιχους χρόνους 0min, 4min, 10min, 15min, 30min και 40min.

Η απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους διπλής δέσμης (JASCO V-530) στα 595nm και στους 37°C για τα δείγματα του πράσινου τσαγιού μετρήθηκε στιγμιαία και έπειτα από επώαση των δειγμάτων με το αντιδραστήριο FRAP 10min. Η μέτρηση της απορρόφησης λήφθηκε σε δυο σειρές δειγμάτων (duplicate).

### **3.2.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΤΗ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΣΙΔΗΡΟΥ**

Στόχος αυτού του πειραματικού σταδίου είναι ο έλεγχος της επίδρασης των κλάσμάτων πεπτιδίων γάλακτος στη διαλυτότητα του σιδήρου.

#### **3.2.4.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ ΣΙΔΗΡΟΥ**

Για την παρασκευή διαλύματος σιδήρου 10ppm, χρησιμοποιήθηκαν 0,04826 gr άλας τα οποία διαλύθηκαν σε 10 ml HCL 0,01 N. Στην συνέχεια ακολουθεί αραιώση του διαλύματος 1:100 από το οποίο προκύπτει το τελικό διάλυμα Fe 10ppm που θα χρησιμοποιηθεί. Για την παρασκευή διαλύματος υδροξυλαμίνης (NH<sub>4</sub>OH) χρησιμοποιήθηκαν 0,5 gr NH<sub>4</sub>OH σε 10ml H<sub>2</sub>O, ενώ για το διάλυμα φεροζίνης χρησιμοποιήθηκαν 0,05 gr φεροζίνης σε 10ml H<sub>2</sub>O.

#### **3.2.4.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ ΣΙΔΗΡΟΥ**

Στα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος, τα οποία απομονώθηκαν στη στήλη χρωματογραφίας διήθησης πηκτής (Sephadex G-25), προστίθεται διάλυμα FeCl<sub>3</sub>\*6H<sub>2</sub>O και αφήνονται προς επώαση προκειμένου να ευνοηθεί η επερχόμενη αλληλεπίδραση του σιδήρου με τα πεπτίδια γάλακτος. Στη συνέχεια η συγκέντρωση του διαλυτού σιδήρου που έχει παραμείνει στο δείγμα και που συνεπώς δεν έχει αλληλεπιδράσει με τα πεπτίδια γάλακτος, προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά με τη μέθοδο της φερροζίνης στα 562 nm [49].

Πιο αναλυτικά, σε 0.2 ml κλάσματος πεπτιδίων προστίθενται 0.1 ml διαλύματος 10 ppm FeCl<sub>3</sub>\*6H<sub>2</sub>O και αφήνεται το περιεχόμενο του δείγματος προς επώαση για 15 min, αφού πρώτα υποστεί ελαφριά περιδίνηση. Ακολούθως, προστίθενται 0.05 ml διαλύματος υδροξυλαμίνης, για την αναγωγή του διαλυμένου τρισθενούς σιδήρου σε δισθενή και στη συνέχεια προστίθενται 0,025 ml διαλύματος φερροζίνης και μετράται άμεσα η απορρόφηση του δείγματος σε φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους διπλής δέσμης (JASCO V-530) στα 562 nm.

Με την αναγωγή του διαλυμένου τρισθενούς σιδήρου σε δισθενή, προσδιορίζεται ο διαλυμένος σίδηρος στο σύνολό του (Fe(II) και Fe(III)).

Οι τελικές συγκεντρώσεις του ολικού διαλυτού σιδήρου για κάθε κλάσμα πεπτιδίων, υπολογίζονται μέσω πρότυπης καμπύλης αναφοράς η οποία κατασκευάζεται από τη μέτρηση απορρόφησης σε φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους διπλής δέσμης (JASCO V-530) στα 562 nm προτύπων διαλυμάτων σιδήρου παρουσία υδροξυλαμίνης.

### **3.2.5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της μεθόδου FRAP έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα STATISTICA, version 5.1. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στα 0,005.

#### 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

##### 4.1. ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FRAP

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κλασμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος που έχουν υποστεί ενζυματική υδρόλυση και χρωματογραφικό διαχωρισμό, σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφονται στις παραγράφους 3.2.1. και 3.2.2. αντίστοιχα, παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1.

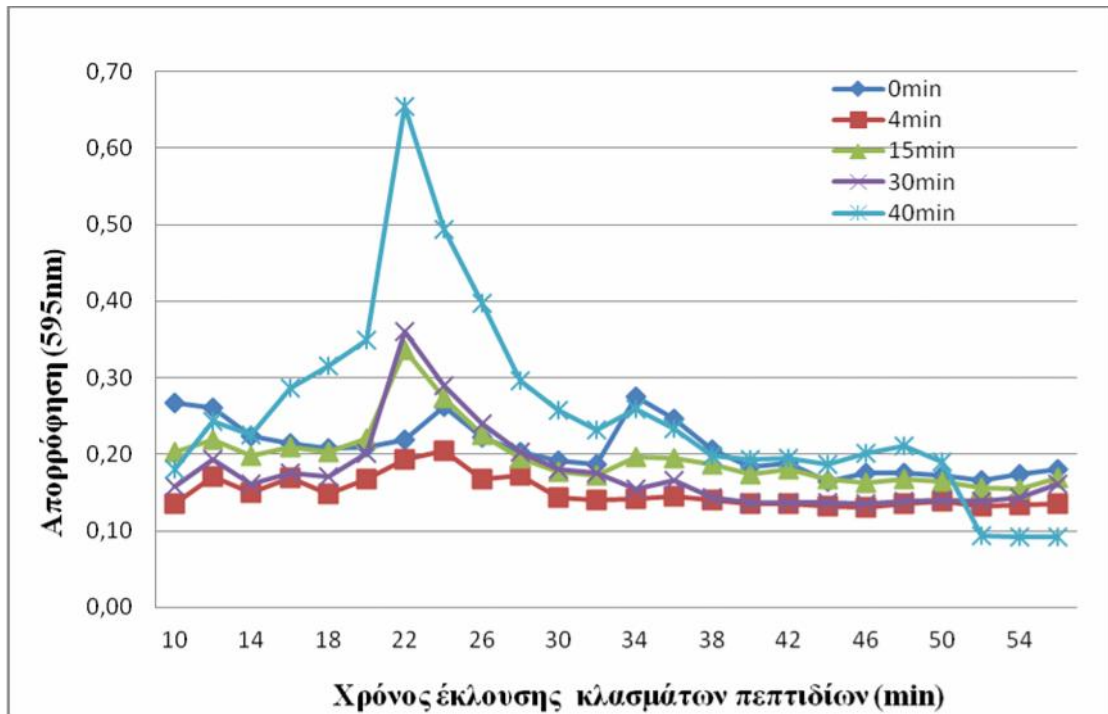
Η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, σύμφωνα με τη μέθοδο Frap προσδιορίζεται από την μέτρηση της απορρόφησης στα 595nm. Συνεπώς η απορρόφηση των κλασμάτων πεπτιδίων κάθε δείγματος αγελαδινού γάλακτος που διαχωρίστηκε σε στήλη διήθησης πηκτής, λήφθηκε μετά από επώαση των δειγμάτων 0 min, 4 min, 15min, 30 min και 40min με τη μέθοδο FRAP. Στον Πίνακα 4.1. παρουσιάζονται όλοι οι μέσοι όροι των παραπάνω μετρήσεων, ενώ στο γράφημα 4.1. παρουσιάζονται συνολικά οι μέσοι όροι των απορροφήσεων κάθε κλάσματος πεπτιδίων γάλακτος μετά από επώαση 0 min, 4 min, 15min, 30min και 40min με τη μέθοδο FRAP.

Με βάση τα ευρήματα που περιγράφονται στο γράφημα 4.1., διαπιστώνεται πως οι τιμές απορρόφησης στα 595nm αυξάνονται όσο αυξάνεται ο χρόνος επώασης των δειγμάτων με το αντιδραστήριο FRAP. Η απορρόφηση των κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος στα 595nm, που λαμβάνεται μετά από επώαση 40 λεπτών των δειγμάτων με τη μέθοδο FRAP έδωσε τις πιο υψηλές τιμές απορρόφησης, συγκριτικά με τις αντίστοιχες απορροφήσεις των δειγμάτων που είχαν επωαστεί 0min, 4 min, 15min, και 30min τη μέθοδο FRAP.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος που εκλούσθηκαν στα 22min (κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος No7), στα 34min (κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος No13) και στα 48min (κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος No20), καθώς έδωσαν τις πιο υψηλές απορροφήσεις από όλα τα υπόλοιπα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος, έπειτα από επώαση 40min των δειγμάτων με τη μέθοδο FRAP.

**Πίνακας 4.1. Απορρόφηση στα 595nm κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος μετά από επώαση 0min, 4min, 15min, 30min και 40min με τη μέθοδο FRAP**

No κλάσματος	Χρόνος έκλουσης (min)	M.O. (0min)	STDEV (0min)	M.O. (4min)	STDEV (4min)	M.O. (15min)	STDEV (15min)	M.O. (30min)	STDEV (30min)	M.O. (40min)	STDEV (40min)
1	10	0,267	0,040	0,136	0,030	0,204	0,063	0,157	0,053	0,243	0,056
2	12	0,261	0,039	0,170	0,040	0,219	0,046	0,193	0,054	0,310	0,051
3	14	0,223	0,032	0,150	0,026	0,197	0,052	0,161	0,042	0,314	0,061
4	16	0,214	0,048	0,169	0,047	0,209	0,063	0,175	0,066	0,426	0,100
5	18	0,208	0,068	0,148	0,036	0,202	0,049	0,170	0,038	0,432	0,109
6	20	0,210	0,071	0,167	0,070	0,221	0,062	0,202	0,058	0,465	0,114
7	22	0,220	0,087	0,194	0,087	0,335	0,168	0,361	0,172	0,642	0,169
8	24	0,262	0,111	0,205	0,165	0,273	0,110	0,289	0,108	0,515	0,117
9	26	0,223	0,082	0,168	0,078	0,226	0,076	0,240	0,077	0,425	0,097
10	28	0,204	0,064	0,172	0,063	0,195	0,047	0,202	0,070	0,385	0,081
11	30	0,192	0,068	0,143	0,054	0,177	0,054	0,180	0,055	0,368	0,084
12	32	0,186	0,063	0,140	0,090	0,172	0,049	0,175	0,052	0,338	0,073
13	34	0,275	0,057	0,142	0,057	0,197	0,063	0,155	0,050	0,408	0,102
14	36	0,247	0,048	0,145	0,057	0,195	0,068	0,165	0,067	0,362	0,081
15	38	0,205	0,056	0,140	0,059	0,187	0,056	0,144	0,037	0,291	0,058
16	40	0,183	0,039	0,135	0,042	0,174	0,043	0,136	0,032	0,289	0,058
17	42	0,189	0,064	0,135	0,067	0,180	0,054	0,137	0,028	0,291	0,06
18	44	0,164	0,035	0,132	0,089	0,168	0,032	0,137	0,025	0,276	0,055
19	46	0,175	0,023	0,130	0,012	0,162	0,022	0,136	0,027	0,303	0,067
20	48	0,175	0,035	0,135	0,036	0,168	0,034	0,139	0,026	0,322	0,072
21	50	0,173	0,035	0,138	0,035	0,164	0,034	0,141	0,032	0,285	0,056
22	52	0,165	0,066	0,132	0,065	0,156	0,038	0,139	0,048	0,172	0,039
23	54	0,174	0,046	0,134	0,046	0,154	0,034	0,143	0,048	0,132	0,039
24	56	0,180	0,062	0,135	0,089	0,169	0,054	0,161	0,073	0,144	0,058



Γράφημα 4.1. Αντιοξειδωτική ικανότητα κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος μετά από επώαση 0min, 4min, 15min, 30min και 40min με τη μέθοδο FRAP (Απορρόφηση στα 595nm).

#### **4.2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΣΙΔΗΡΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FRAP**

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κλασμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος παρουσία Σιδήρου, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.3.2. παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2.

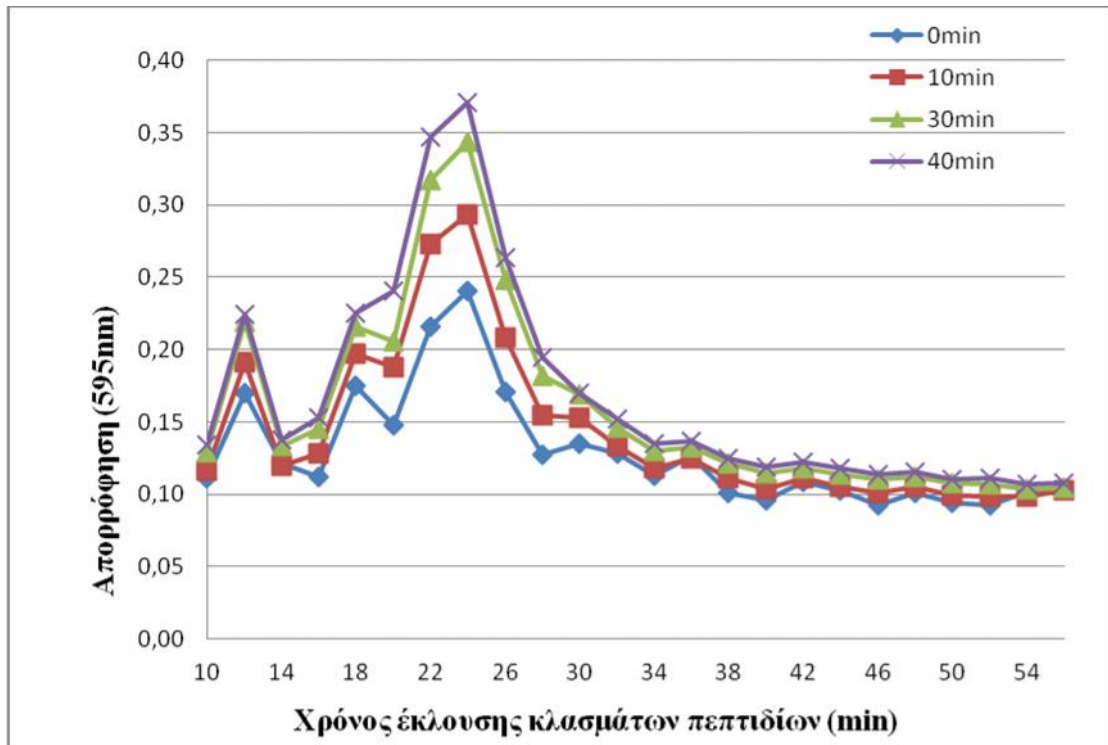
Η απορρόφηση των κλασμάτων πεπτιδίων κάθε δείγματος αγελαδινού γάλακτος που διαχωρίστηκε σε στήλη διήθησης πηκτής λήφθηκε μετά από επώαση των δειγμάτων 0min, 10min, 30min και 40min με τη μέθοδο FRAP. Στον Πίνακα 4.2 παρουσιάζονται όλοι οι μέσοι όροι των παραπάνω μετρήσεων, ενώ στο γράφημα 4.2 παρουσιάζονται συνολικά οι μέσοι όροι των απορροφήσεων κάθε κλάσματος πεπτιδίων γάλακτος μετά από επώαση 0min, 10min, 30min και 40min με τη μέθοδο FRAP.

Με βάση τα ευρήματα που περιγράφονται στο γράφημα 4.2, διαπιστώνεται πως με πάροδο του χρόνου επώασης των δειγμάτων με το αντιδραστήριο FRAP, η απορρόφηση του κάθε κλάσματος πεπτιδίων αυξάνεται σταδιακά, δίνοντας δυο σημαντικές κορυφές στα 12min (κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος Νο2) και στα 24min (κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος Νο8). Η απορρόφηση των κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος στα 595nm, που λαμβάνεται μετά από επώαση 40min των δειγμάτων με τη μέθοδο FRAP έδωσε τις πιο υψηλές τιμές απορρόφησης, συγκριτικά με τις αντίστοιχες απορροφήσεις των δειγμάτων που είχαν επωαστεί 0min, 10min, 30min και 40min τη μέθοδο FRAP.

Τα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος που εκλούσθηκαν στα 12min (κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος Νο2) και 24min (κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος Νο8), έδωσαν τις πιο υψηλές τιμές απορρόφησης από όλα τα υπόλοιπα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος που είχαν επωαστεί 0min, 10min και 30min με τη μέθοδο FRAP

**Πίνακας 4.2.** Απορρόφηση στα 595nm κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος παρουσία Σιδήρου μετά από επώαση 0min, 10min, 30min και 40min με τη μέθοδο FRAP.

No κλάσματος	Χρόνος έκλουσης (min)	M.O. (0min)	STDEV (0min)	M.O. (10min)	STDEV (10min)	M.O. (30min)	STDEV (30min)	M.O. (40min)	STDEV (40min)
1	10	0,110	0,009	0,116	0,037	0,129	0,046	0,134	0,036
2	12	0,164	0,073	0,191	0,148	0,219	0,178	0,225	0,119
3	14	0,121	0,008	0,120	0,033	0,133	0,042	0,138	0,035
4	16	0,112	0,005	0,128	0,008	0,145	0,008	0,153	0,008
5	18	0,175	0,040	0,197	0,070	0,216	0,082	0,226	0,077
6	20	0,148	0,014	0,188	0,049	0,205	0,035	0,241	0,071
7	22	0,216	0,033	0,273	0,061	0,318	0,083	0,347	0,070
8	24	0,241	0,101	0,293	0,145	0,344	0,169	0,371	0,114
9	26	0,171	0,038	0,208	0,064	0,249	0,079	0,263	0,046
10	28	0,128	0,018	0,154	0,026	0,182	0,038	0,194	0,027
11	30	0,135	0,014	0,153	0,026	0,169	0,031	0,170	0,031
12	32	0,129	0,015	0,134	0,016	0,146	0,022	0,152	0,029
13	34	0,113	0,013	0,118	0,009	0,130	0,011	0,135	0,014
14	36	0,127	0,032	0,125	0,023	0,133	0,013	0,137	0,013
15	38	0,101	0,006	0,111	0,007	0,121	0,006	0,125	0,020
16	40	0,096	0,004	0,103	0,005	0,115	0,011	0,119	0,013
17	42	0,109	0,020	0,111	0,014	0,118	0,009	0,122	0,024
18	44	0,103	0,008	0,105	0,004	0,114	0,006	0,118	0,019
19	46	0,092	0,003	0,101	0,006	0,110	0,007	0,114	0,021
20	48	0,101	0,008	0,105	0,005	0,112	0,006	0,115	0,015
21	50	0,094	0,005	0,099	0,006	0,107	0,008	0,111	0,019
22	52	0,092	0,007	0,099	0,008	0,107	0,009	0,111	0,018
23	54	0,101	0,013	0,098	0,006	0,103	0,006	0,107	0,023
24	56	0,102	0,017	0,103	0,013	0,104	0,004	0,108	0,016



**Γράφημα 4.2.** Αντιοξειδωτική ικανότητα κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος παρουσία Σιδήρου μετά από επώαση 0min, 10min, 30min και 40min με τη μέθοδο FRAP (Απορρόφηση 595nm)



#### **4.3.ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FRAP**

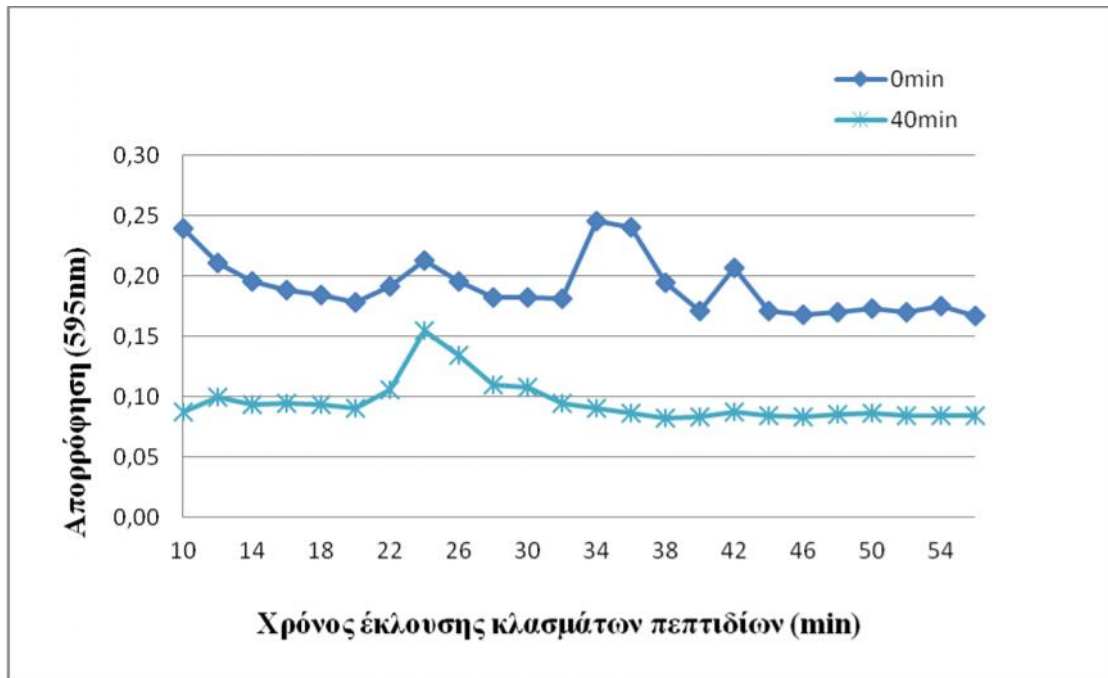
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κλασμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος, στα οποία έχει προστεθεί Ψευδάργυρος, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.3.2. παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.3.

Η απορρόφηση των κλασμάτων πεπτιδίων κάθε δείγματος αγελαδινού γάλακτος που διαχωρίστηκε σε στήλη διήθησης πηκτής λήφθηκε μόνο μετά από επώαση των δειγμάτων 0min και 40min με τη μέθοδο FRAP. Στον Πίνακα 4.3 παρουσιάζονται όλοι οι μέσοι όροι των παραπάνω μετρήσεων, ενώ στο γράφημα 4.3. παρουσιάζονται συνολικά τα αποτελέσματα κάθε κλάσματος πεπτιδίων γάλακτος μετά από επώαση 0min και 40min.

Με βάση τα ευρήματα που περιγράφονται στο γράφημα 4.3., διαπιστώνεται πως οι τιμές απορρόφησης στα 595nm μειώνονται όσο αυξάνεται ο χρόνος επώασης των δειγμάτων με το αντιδραστήριο FRAP. Η απορρόφηση των κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος στα 595nm, που λαμβάνεται μετά από επώαση 40 λεπτών με τη μέθοδο FRAP, έδωσε πιο χαμηλές τιμές απορρόφησης, συγκριτικά με τις αντίστοιχες απορροφήσεις των δειγμάτων που είχαν επωαστεί 0min τη μέθοδο FRAP.

**Πίνακας 4.3. Απορρόφηση στα 595nm κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος παρουσία Ψευδαργύρου μετά από επώαση 0min και 40min με τη μέθοδο FRAP.**

No κλάσματος	Χρόνος έκλυσης (min)	M.O. (0min)	STDEV	M.O. (40min)	STDEV
1	10	0,239	0,067	0,088	0,007
2	12	0,211	0,061	0,100	0,008
3	14	0,195	0,040	0,094	0,004
4	16	0,189	0,034	0,095	0,017
5	18	0,184	0,046	0,094	0,013
6	20	0,179	0,040	0,091	0,005
7	22	0,192	0,047	0,106	0,015
8	24	0,213	0,065	0,155	0,067
9	26	0,195	0,053	0,135	0,044
10	28	0,183	0,043	0,110	0,025
11	30	0,183	0,046	0,108	0,025
12	32	0,182	0,051	0,095	0,008
13	34	0,246	0,076	0,090	0,007
14	36	0,241	0,055	0,087	0,004
15	38	0,195	0,042	0,083	0,003
16	40	0,171	0,040	0,084	0,007
17	42	0,206	0,053	0,088	0,010
18	44	0,171	0,044	0,085	0,006
19	46	0,168	0,040	0,084	0,005
20	48	0,170	0,043	0,086	0,005
21	50	0,173	0,033	0,086	0,011
22	52	0,170	0,041	0,085	0,008
23	54	0,176	0,051	0,085	0,006
24	56	0,167	0,042	0,085	0,006



**Γράφημα 4.3.** Αντιοξειδωτική ικανότητα κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος παρουσία Ψευδαργύρου μετά από επώαση 0min και 40min με τη μέθοδο FRAP (Απορρόφηση 595nm)

#### 4.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΤΗ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ ΣΙΔΗΡΟΥ

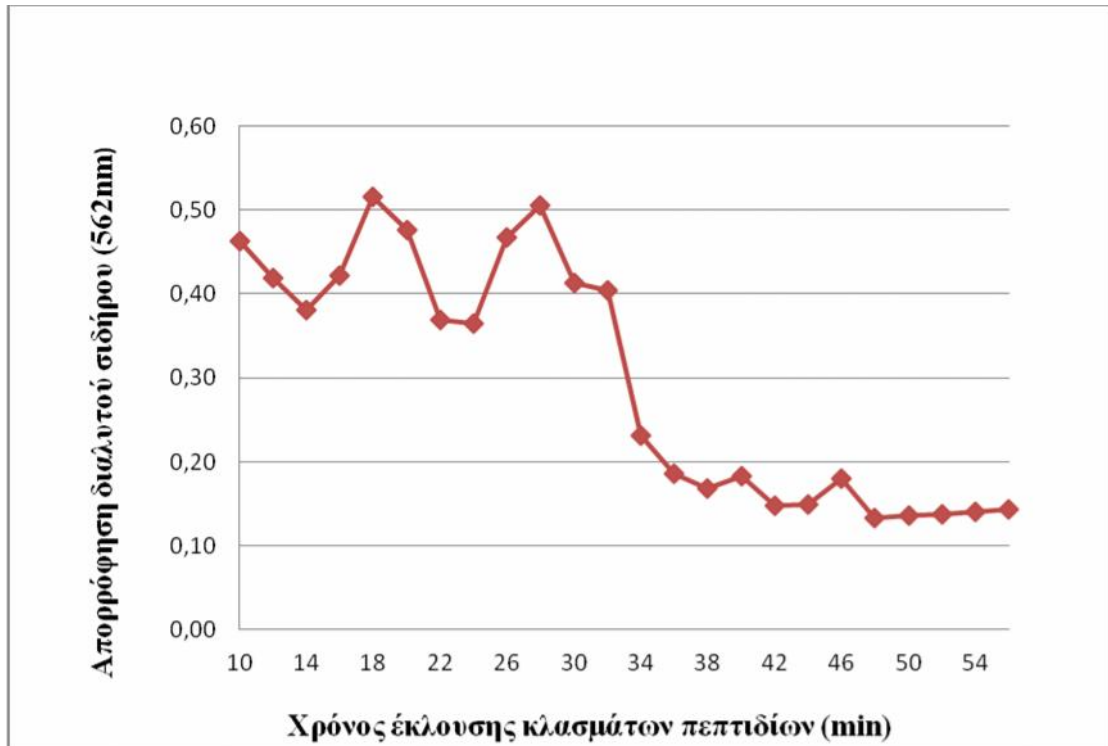
Οι απορροφήσεις του διαλυτού σιδήρου μετά από επώαση τρισθενούς σιδήρου με κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος, σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.4.2. παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.4.

Η μέτρηση της απορρόφησης στα 562nm εκφράζει το ποσοστό σχηματισμού διαλυτού σιδήρου έπειτα από επώαση τρισθενούς σιδήρου με πεπτίδια αγελαδινού γάλακτος. Συνεπώς η ιδιότητα των πεπτιδίων γάλακτος να αυξάνουν τη διαλυτότητα του προστιθέμενου τρισθενούς σιδήρου αντικατοπτρίζει την επίδραση των πεπτιδίων γάλακτος στη διαλυτότητα του Σιδήρου. Το ποσοστό διαλυτότητας του σιδήρου αποτελεί δείκτης βιοδιαθεσιμότητας του στον οργανισμό. Στον Πίνακα 4.4 παρουσιάζονται όλοι οι μέσοι όροι των παραπάνω μετρήσεων, ενώ στο γράφημα 3.4 παρουσιάζονται συνολικά τα αποτελέσματα της επίδρασης των πεπτιδίων γάλακτος στη διαλυτότητα σιδήρου.

Με βάση τα ευρήματα που περιγράφονται στο γράφημα 4.4, διαπιστώνεται πως τα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος που εκλούσθηκαν στα 18min (κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος Νο5) και 28min (κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος Νο10) ασκούν την ισχυρότερη επίδραση αυξάνουν τη διαλυτότητα του σιδήρου.

**Πίνακας 4.4. Φασματομετρική απορρόφηση διαλυτού σιδήρου στα 562nm μετά από επώαση τρισθενούς σιδήρου με κλάσματα πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος**

No κλάσματος	Χρόνος έκλυσης (min)	MO (562nm)	STDEV
1	10	0,463	0,596
2	12	0,418	0,369
3	14	0,381	0,281
4	16	0,421	0,392
5	18	0,516	0,473
6	20	0,476	0,447
7	22	0,370	0,273
8	24	0,365	0,240
9	26	0,467	0,300
10	28	0,505	0,424
11	30	0,413	0,582
12	32	0,404	0,531
13	34	0,232	0,097
14	36	0,186	0,072
15	38	0,168	0,066
16	40	0,183	0,094
17	42	0,148	0,069
18	44	0,149	0,075
19	46	0,181	0,079
20	48	0,133	0,026
21	50	0,136	0,031
22	52	0,137	0,028
23	54	0,140	0,033
24	56	0,144	0,034



**Γράφημα 4.4. Φασματομετρική απορρόφηση διαλυτού σιδήρου στα 562nm μετά από επώαση τρισθενούς σιδήρου με πεπτίδια αγελαδινού γάλακτος**

**4.5.ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΠΡΑΣΙΝΟΥ ΤΣΑΓΙΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FRAP**

Στον Πίνακα 4.5. παρουσιάζεται η απορρόφηση στα 595nm εκχυλίσματος πράσινου τσαγιού, μετά από επώαση 0min και 10min με τη μέθοδο FRAP. Το δείγμα πράσινου τσαγιού παρασκευάστηκε σύμφωνα με την παράγραφο 3.2.3.3.

**Πίνακας 4.5. Απορρόφηση στα 595nm εκχυλίσματος πράσινου τσαγιού μετά από επώαση 0min και 10min με τη μέθοδο FRAP.**

Προϊόν	M.O (0min)	STDEV (0min)	M.O (10min)	STDEV (10min)
Πράσινο Τσάι	0,492	0,004	0,745	0,013

#### **4.6.ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΙΔΗΡΟΥ ΚΑΙ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ**

Με βάση τα ευρήματα των παραπάνω παραγράφων (4.1., 4.2., 4.3., 4.5.) προκύπτει ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα των πεπτιδίων είναι ασθενής συγκριτικά με άλλα ισχυρά αντιοξειδωτικά, όπως το τσάι του οποίου η αντιοξειδωτική ικανότητα είναι περίπου 200 φορές υψηλότερη από εκείνη των κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος που επώαστηκαν 10min με τη μέθοδο FRAP (Πίνακας 4.5.). Συνεπώς η περαιτέρω μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος και η επίδραση της παρουσίας σιδήρου και ψευδαργύρου στην αντιοξειδωτική ικανότητα των κλασμάτων πεπτιδίων θα περιοριστεί στα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά από επώαση 40min με το αντιδραστήριο FRAP.

##### **4.6.1. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΩΑΣΗ 40min ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FRAP.**

Σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο Statistica στις μετρήσεις της αντιοξειδωτικής ικανότητας πεπτιδίων γάλακτος μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP, προέκυψαν τα στοιχεία που παρουσιάζονται στα κεφάλαια 4.6.1.1. (στατιστική ανάλυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κλασμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος με τη μέθοδο FRAP), 4.6.1.2. (στατιστική ανάλυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κλασμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος παρουσία Σιδήρου με τη μέθοδο FRAP) και 4.6.1.3. (στατιστική ανάλυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κλασμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος παρουσία Ψευδαργύρου με τη μέθοδο FRAP).



#### 4.6.1.1. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FRAP

Τα δεδομένα που εξήχθησαν κατά την στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων της αντιοξειδωτικής ικανότητας κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP παρουσιάζονται στους Πίνακες 4.6.1.1.1 και 4.6.1.1.2.

**Πίνακας 4.6.1.1.1. Περιγραφική Ανάλυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας κλασμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.**

No κλάσματος	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	20	,18375	,089852	,020091	,14170	,22580	,073	,350
2	20	,24245	,069745	,015595	,20981	,27509	,080	,345
3	20	,22595	,062235	,013916	,19682	,25508	,118	,339
4	20	,28715	,095510	,021357	,24245	,33185	,140	,542
5	20	,31505	,120304	,026901	,25875	,37135	,089	,532
6	20	,34970	,114643	,025635	,29605	,40335	,129	,581
7	20	,65400	,081964	,018328	,61564	,69236	,520	,800
8	20	,49420	,108049	,024160	,44363	,54477	,339	,780
9	19	,39747	,063121	,014481	,36705	,42790	,300	,580
10	20	,29660	,106759	,023872	,24664	,34656	,112	,578
11	20	,25755	,072909	,016303	,22343	,29167	,130	,377
12	20	,23125	,102533	,022927	,18326	,27924	,120	,470
13	20	,25865	,093916	,021000	,21470	,30260	,110	,483
14	20	,23250	,086229	,019282	,19214	,27286	,104	,405
15	20	,19800	,049801	,011136	,17469	,22131	,103	,305
16	20	,19380	,061354	,013719	,16509	,22251	,099	,298
17	20	,19640	,064035	,014319	,16643	,22637	,100	,300
18	20	,18665	,044231	,009890	,16595	,20735	,098	,280
19	20	,20135	,082315	,018406	,16283	,23987	,090	,321
20	20	,21070	,056040	,012531	,18447	,23693	,099	,326
21	20	,19080	,063930	,014295	,16088	,22072	,096	,300
22	20	,09370	,040677	,009096	,07466	,11274	,021	,214
23	20	,09255	,036611	,008186	,07542	,10968	,044	,177
24	20	,09240	,026017	,005818	,08022	,10458	,049	,144
Total	479	,25314	,145036	,006627	,24012	,26616	,021	,800

**Πίνακας 4.6.1.1.2. Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κλασμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.**

ΑΝΑΛΥΣΗ ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7,221	23	,314	50,398	,000
Within Groups	2,834	455	,006		
Total	10,055	478			

Σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα 4.1., 4.6.1.1.1. και 4.6.1.1.2. τα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος που παρουσιάζουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον όσον αφορά την αντιοξειδωτική τους ικανότητα είναι τα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος Νο7 (χρόνος έκλουσης 22min), Νο6 (χρόνος έκλουσης 20min), Νο8 (χρόνος έκλουσης 24min), Νο9 (χρόνος έκλουσης 26min) Νο13 (χρόνος έκλουσης 34min) και Νο20 (χρόνος έκλουσης 48min). Στην στατιστική επεξεργασία ελέγχθηκε κατά πόσο τα εν λόγω κλάσματα πεπτιδίων διαφέρουν μεταξύ τους ή όχι. Με βάση το επίπεδο σημαντικότητας που έχει οριστεί στο 0,005., προκύπτουν τα εξής:

Το κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος Νο7 (χρόνος έκλουσης 22min) διαφέρει από τα υπόλοιπα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος που εκλούστηκαν έως τα 56min χρωματογραφίας. Ομοίως και για το κλάσμα Νο8 (χρόνος έκλουσης 24min) που φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντικό από τα υπόλοιπα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος που εκλούστηκαν έως τα 56min χρωματογραφίας.

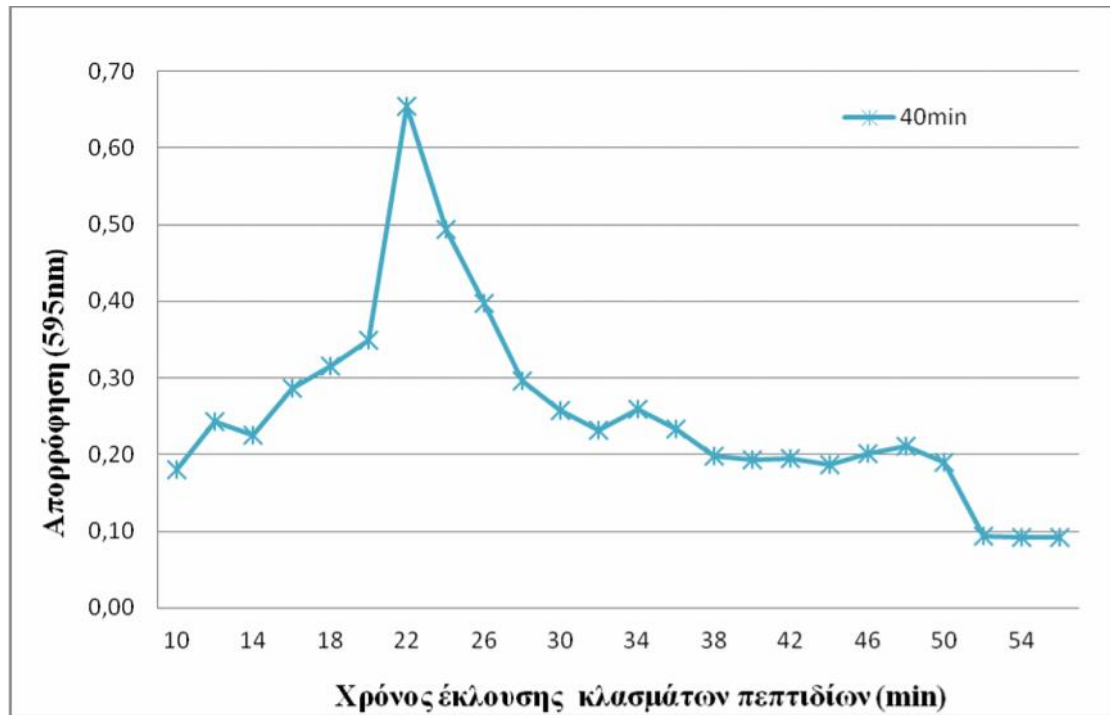
Αντιθέτως το κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος Νο6 (χρόνος έκλουσης 20min) δεν διαφέρει σημαντικά από τα δείγματα Νο4 (χρόνος έκλουσης 16min), Νο5 (χρόνος έκλουσης 18min), Νο9 (χρόνος έκλουσης 26min) και Νο10 (χρόνος έκλουσης 28min). Τέλος, το κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος Νο13 (χρόνος έκλουσης 34min) διαφέρει από τα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος Νο6 (χρόνος έκλουσης 20min), Νο7 (χρόνος έκλουσης 22min), Νο9 (χρόνος έκλουσης 26min), Νο20 (χρόνος έκλουσης 48min) και Νο8 (χρόνος έκλουσης 24min).

Στον Πίνακα 4.6.1.1.3. παρουσιάζονται αναλυτικά οι βαθμοί σημαντικότητας κάθε κλάσματος πεπτιδίων γάλακτος και στο Γράφημα 4.6.1.1. παρουσιάζεται η αντιοξειδωτική ικανότητα κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP (Απορρόφηση στα 595nm).

Συνεπώς το κλάσμα πεπτιδίων με τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα στα 40min επώασης των κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος με τη μέθοδο FRAP είναι το κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος Νο7 (χρόνος έκλουσης 22min). Ακολουθεί το πεπτιδικό κλάσμα γάλακτος Νο8 (χρόνος έκλουσης 24min) και στη συνέχεια τα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος Νο4 (χρόνος έκλουσης 16min), Νο5 (χρόνος έκλουσης 18min), Νο9 (χρόνος έκλουσης 26min), Νο20 (χρόνος έκλουσης 48min) και Νο10 (χρόνος έκλουσης 28min).

**Πίνακας 4.6.1.1.3. Ανάλυση σημαντικότητας της αντιοξειδωτικής ικανότητας κλασμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.**

No κλάσματος	Χρόνος έκλυσης (min)	Σημαντικότητα
1	10	d
2	12	d
3	14	d
4	16	c
5	18	c
6	20	c
7	22	a
8	24	b
9	26	c
10	28	c
11	30	d
12	32	d
13	34	d
14	36	d
15	38	e
16	40	e
17	42	e
18	44	e
19	46	e
20	48	c
21	50	e
22	52	e
23	54	e
24	56	e



Γράφημα 4.6.1.1. Αντιοξειδωτική ικανότητα κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP (Απορρόφηση στα 595nm).

**4.6.1.2. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΣΙΔΗΡΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FRAP**

Τα δεδομένα που εξήχθησαν κατά την στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κλασμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος παρουσία Σιδήρου μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP παρουσιάζονται στους Πίνακες 4.6.1.2.1. και 4.6.1.2.2.

**Πίνακας 4.6.1.2.1. Περιγραφική Ανάλυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας κλασμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος παρουσία Σιδήρου μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.**

No κλάσματος	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	20	,13350	,036293	,008115	,11651	,15049	,043	,200
2	20	,22450	,119341	,026685	,16865	,28035	,062	,648
3	20	,13770	,034805	,007783	,12141	,15399	,044	,190
4	20	,15290	,007907	,001768	,14920	,15660	,138	,168
5	20	,22570	,077336	,017293	,18951	,26189	,114	,391
6	20	,24050	,070983	,015872	,20728	,27372	,140	,369
7	20	,34695	,069735	,015593	,31431	,37959	,248	,492
8	20	,37085	,114139	,025522	,31743	,42427	,226	,790
9	19	,26432	,046522	,010673	,24189	,28674	,168	,370
10	20	,19435	,026522	,005930	,18194	,20676	,132	,248
11	20	,16975	,030757	,006877	,15536	,18414	,129	,250
12	20	,15225	,028831	,006447	,13876	,16574	,110	,220
13	20	,13475	,014293	,003196	,12806	,14144	,100	,165
14	20	,13680	,013285	,002971	,13058	,14302	,118	,180
15	20	,12450	,019672	,004399	,11529	,13371	,100	,189
16	20	,11860	,013343	,002984	,11236	,12484	,100	,160
17	20	,12185	,024130	,005396	,11056	,13314	,080	,200
18	20	,11785	,019247	,004304	,10884	,12686	,090	,190
19	20	,11385	,021134	,004726	,10396	,12374	,073	,180
20	20	,11495	,015466	,003458	,10771	,12219	,071	,142
21	20	,11075	,019292	,004314	,10172	,11978	,070	,170
22	20	,11075	,018212	,004072	,10223	,11927	,080	,170
23	20	,10660	,022710	,005078	,09597	,11723	,070	,180
24	20	,10780	,016302	,003645	,10017	,11543	,072	,136
Total	479	,16781	,086644	,003959	,16003	,17559	,043	,790

**Πίνακας 4.6.1.2.2. Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κλασμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος παρουσία Σιδήρου μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.**

ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΟΒΑ					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,556	23	,111	48,969	,000
Within Groups	1,033	455	,002		
Total	3,588	478			

Σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα 4.2., 4.6.1.2.1. και 4.6.1.2.2. τα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος που παρουσιάζουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον όσον αφορά την αντιοξειδωτική τους ικανότητα είναι τα κλάσματα πεπτιδίων No8 (24min), No7 (22min), No6 (20min), No5 (18min), No9 (26min) και No2 (12min).

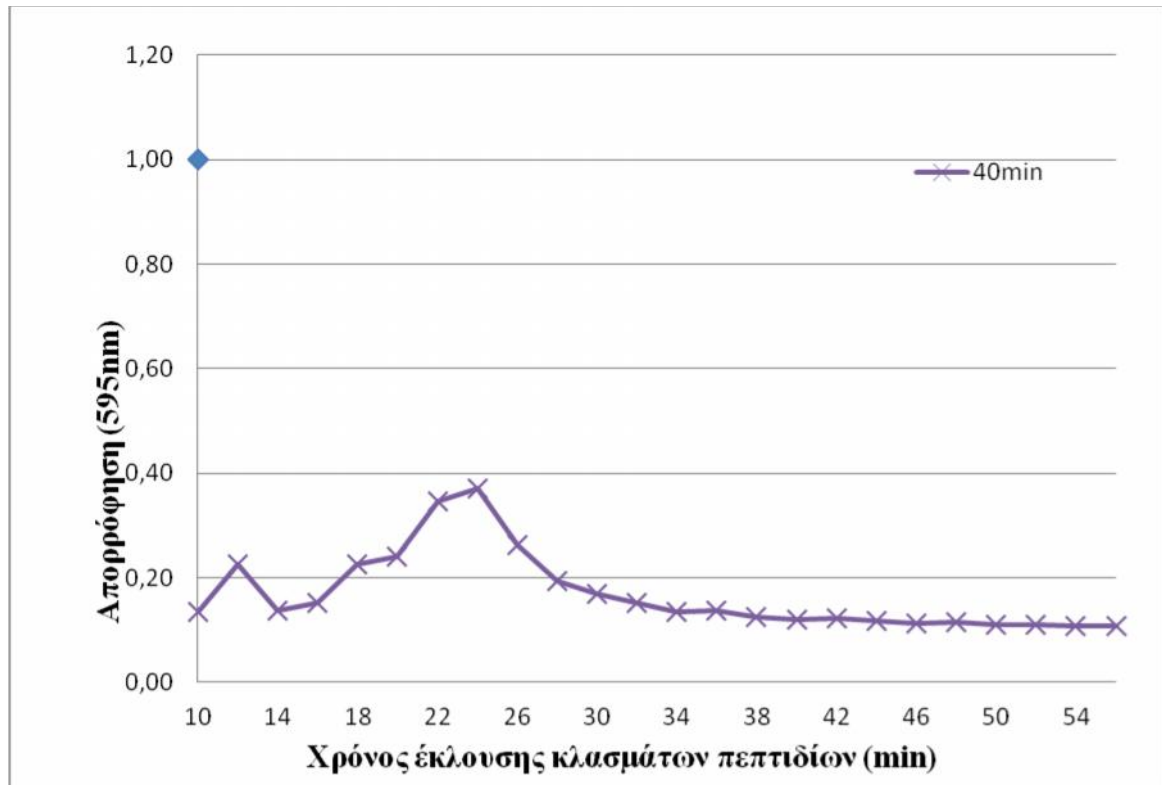
Σύμφωνα με τη στατιστική επεξεργασία, τα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος No7 (χρόνος έκλυσης 22min) και No8 (χρόνος έκλυσης 24min) δεν διαφέρουν μεταξύ τους, ενώ διαφέρουν με τα υπόλοιπα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος που εκλούσθηκαν έως τα 56min χρωματογραφίας. Ομοίως και για τα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος No5 (χρόνος έκλυσης 18min), No6 (χρόνος έκλυσης 20min), No9 (χρόνος έκλυσης 26min) και No2 (χρόνος έκλυσης 12min) τα οποία δεν διαφέρουν μεταξύ τους, ενώ διαφέρουν με όλα τα υπόλοιπα πεπτιδικά κλάσματα γάλακτος.

Στον Πίνακα 4.6.1.2.3. παρουσιάζονται αναλυτικά οι βαθμοί σημαντικότητας κάθε κλάσματος πεπτιδίων γάλακτος και στο Γράφημα 4.6.1.2. παρουσιάζεται η αντιοξειδωτική ικανότητα κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος παρουσία Σιδήρου μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP (Απορρόφηση στα 595nm).

Συνεπώς τα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος με τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα παρουσία σιδήρου, τα οποία επώαστηκαν 40min με τη μέθοδο FRAP είναι τα πεπτιδικά κλάσματα γάλακτος No7 (χρόνος έκλυσης 22min) και No8 (χρόνος έκλυσης 24min). Ακολουθούν τα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος No5 (χρόνος έκλυσης 18min), No6 (χρόνος έκλυσης 20min), No9 (χρόνος έκλυσης 26min) και No2 (χρόνος έκλυσης 12min).

**Πίνακας 4.6.1.2.3. Ανάλυση σημαντικότητας της αντιοξειδωτικής ικανότητας κλασμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος παρουσία Σιδήρου μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.**

<b>No κλάσματος</b>	<b>Χρόνος έκλυσης (min)</b>	<b>Σημαντικότητα</b>
1	10	d
2	12	b
3	14	d
4	16	c
5	18	b
6	20	b
7	22	a
8	24	a
9	26	b
10	28	c
11	30	c
12	32	c
13	34	d
14	36	d
15	38	d
16	40	d
17	42	d
18	44	d
19	46	d
20	48	d
21	50	d
22	52	d
23	54	d
24	56	d



**Γράφημα 4.6.1.2. Αντιοξειδωτική ικανότητα κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος παρουσία Σιδήρου μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP (Απορρόφηση στα 595nm).**



**3.6.1.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ**

Τα δεδομένα που εξήχθησαν κατά την στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων της αντιοξειδωτικής ικανότητας κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος παρουσία Ψευδαργύρου μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP παρουσιάζονται στους Πίνακες 4.6.1.3.1. και 4.6.1.3.2.

**Πίνακας 4.6.1.3.1. Περιγραφική Ανάλυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας κλασμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος παρουσία Ψευδάργυρου μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.**

No κλάσματος	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	13	,08792	,007274	,002017	,08353	,09232	,080	,105
2	13	,10000	,008206	,002276	,09504	,10496	,086	,115
3	13	,09415	,003976	,001103	,09175	,09656	,086	,099
4	13	,09631	,016188	,004490	,08653	,10609	,078	,138
5	13	,09385	,013050	,003619	,08596	,10173	,087	,129
6	13	,09100	,004950	,001373	,08801	,09399	,083	,098
7	13	,10608	,014841	,004116	,09711	,11505	,076	,125
8	13	,15462	,067406	,018695	,11388	,19535	,105	,293
9	13	,13492	,043693	,012118	,10852	,16133	,100	,261
10	13	,11031	,025061	,006951	,09516	,12545	,087	,163
11	13	,10762	,025204	,006990	,09238	,12285	,084	,173
12	13	,09523	,008438	,002340	,09013	,10033	,084	,111
13	13	,09031	,007227	,002004	,08594	,09467	,079	,101
14	13	,08654	,004352	,001207	,08391	,08917	,080	,092
15	13	,08262	,003042	,000844	,08078	,08445	,078	,089
16	13	,08354	,006628	,001838	,07953	,08754	,070	,097
17	13	,08754	,010437	,002895	,08123	,09385	,070	,110
18	13	,08462	,006371	,001767	,08077	,08847	,071	,095
19	14	,08364	,004798	,001282	,08087	,08641	,072	,089
20	13	,08562	,005316	,001474	,08240	,08883	,076	,097
21	13	,08615	,011342	,003146	,07930	,09301	,070	,115
22	13	,08485	,008464	,002348	,07973	,08996	,075	,109
23	13	,08454	,005532	,001534	,08120	,08788	,077	,093
24	13	,08454	,006385	,001771	,08068	,08840	,070	,095
Total	313	,09565	,025339	,001432	,09283	,09847	,070	,293

**Πίνακας 4.6.1.3.2. Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κλάσμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος παρουσία Ψευδαργύρου μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.**

ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΟΒΑ					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,090	23	,004	10,237	,000
Within Groups	,110	289	,000		
Total	,200	312			

Σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα 4.3., 4.6.1.3.1. και 4.6.1.3.2. τα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος που παρουσιάζουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον όσον αφορά την αντιοξειδωτική τους ικανότητα παρουσία Ψευδαργύρου είναι τα κλάσματα Νο8 (24min), Νο9 (26min), Νο10 (20min), Νο11 (30min), Νο7 (22min) και το Νο2 (12min).

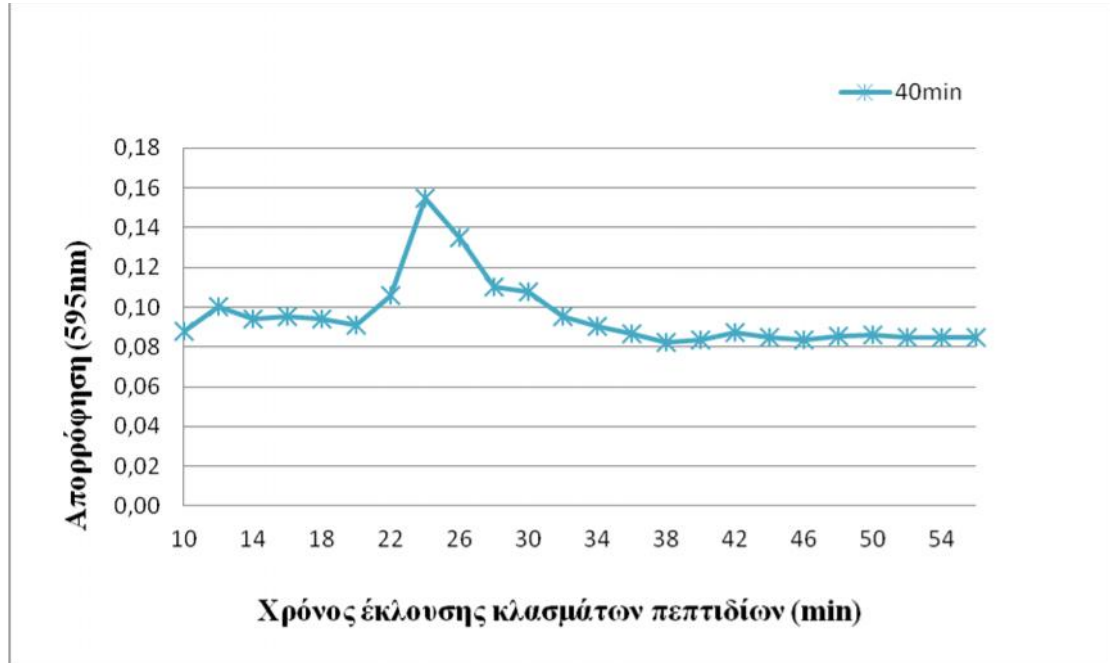
Τα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος Νο8 (χρόνος έκλουσης 24min) και Νο9 (χρόνος έκλουσης 26min) και δεν διαφέρουν μεταξύ τους, ενώ διαφέρουν με τα υπόλοιπα κλάσματα πεπτιδίων που εκλούστηκαν έως τα 56min χρωματογραφίας. Ομοίως και για τα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος Νο10 (χρόνος έκλουσης 20min), Νο11 (χρόνος έκλουσης 30min), Νο7 (χρόνος έκλουσης 22min) και Νο2 (χρόνος έκλουσης 12min) τα οποία δεν διαφέρουν μεταξύ τους.

Στον Πίνακα 4.6.1.3.3. παρουσιάζονται αναλυτικά οι βαθμοί σημαντικότητας κάθε κλάσματος πεπτιδίων γάλακτος και στο Γράφημα 4.6.1.3. παρουσιάζεται η αντιοξειδωτική ικανότητα κλάσμάτων πεπτιδίων γάλακτος παρουσία Ψευδαργύρου μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP (Απορρόφηση στα 595nm).

Συνεπώς τα κλάσματα πεπτιδίων με τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα στα 40min της μεθόδου Frap στα οποία έχει προστεθεί Ψευδάργυρος είναι το Νο8 (χρόνος έκλουσης 24min) και Νο9 (χρόνος έκλουσης 26min). Ακολουθούν τα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος Νο10 (χρόνος έκλουσης 20min), Νο11 (χρόνος έκλουσης 30min), Νο7 (χρόνος έκλουσης 22min) και Νο2 (χρόνος έκλουσης 12min).

**Πίνακας 4.6.1.3.3. Ανάλυση σημαντικότητας της αντιοξειδωτικής ικανότητας κλασμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος παρουσία Ψευδαργύρου μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.**

No κλάσματος	Χρόνος έκλουσης (min)	Σημαντικότητα
1	10	d
2	12	b
3	14	d
4	16	d
5	18	d
6	20	d
7	22	b
8	24	a
9	26	a
10	28	b
11	30	b
12	32	d
13	34	d
14	36	d
15	38	c
16	40	d
17	42	d
18	44	d
19	46	c
20	48	d
21	50	d
22	52	d
23	54	d
24	56	d



Γράφημα 4.6.1.3. Αντιοξειδωτική ικανότητα κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος παρουσία Ψευδαργύρου μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP (Απορρόφηση στα 595nm)

#### 4.6.1.4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΣΙΔΗΡΟΥ ΚΑΙ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Βάσει των αποτελεσμάτων που καταγράφηκαν στις παραγράφους 4.6.1.1., 4.6.1.2. και 4.6.1.3. επιλέχθηκαν τα παρακάτω κλάσματα πεπτιδίων για περαιτέρω στατιστική επεξεργασία, προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσο η επίδραση Σιδήρου και Ψευδαργύρου επηρεάζει σημαντικά την αντιοξειδωτική ικανότητα των εν λόγω κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος.

Τα επιλεγθέντα κλάσματα πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος που παρουσιάζουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος είναι τα εξής No7 (22min), No8 (24min), No13 (34min) και το No20 (48min). Στην στατιστική επεξεργασία η ομαδοποίηση έχει γίνει ανάλογα την παρουσία Σιδήρου (αριθμός 2) ή Ψευδαργύρου (αριθμός 3) στα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος, ενώ το κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος που δεν περιέχει Σίδηρο ή Ψευδάργυρο χαρακτηρίζεται με τον αριθμό 3.

Στους Πίνακες 4.6.1.4.1. και 4.6.1.4.2. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κλάσματος πεπτιδίων γάλακτος No7 (χρόνος έκλουσης 22min) μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.

**Πίνακας 4.6.1.4.1. Περιγραφική Ανάλυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κλάσματος πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος No7 (χρόνος έκλουσης 22min) μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.**

Ομάδα	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος	13	,62392	,075166	,020847	,57850	,66935	,520	,799
Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος παρουσία Σιδήρου	13	,34462	,046640	,012936	,31643	,37280	,280	,456
Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος παρουσία Ψευδαργύρου	13	,10608	,014841	,004116	,09711	,11505	,076	,125
Total	39	,35821	,220240	,035267	,28681	,42960	,076	,799

**Πίνακας 4.6.1.4.2. Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κλάσματος πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος No7 (χρόνος έκλουσης 22min) μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.**

ΑΝΑΛΥΣΗ ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,747	2	,873	325,652	,000
Within Groups	,097	36	,003		
Total	1,843	38			

Με βάση το επίπεδο σημαντικότητας που έχει οριστεί στο 0,005., προκύπτει πως η αντιοξειδωτική ικανότητα του εν λόγω κλάσματος πεπτιδίων γάλακτος (No7) διαφέρει όταν προστίθεται Σίδηρος ή Ψευδάργυρος. Συνεπώς η αντιοξειδωτική ικανότητα του συγκεκριμένου κλάσματος πεπτιδίων γάλακτος μειώνεται με την παρουσία Σιδήρου ή Ψευδαργύρου.

Στους Πίνακες 4.6.1.4.3. και 4.6.1.4.4. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κλάσματος πεπτιδίων γάλακτος Νο8 (χρόνος έκλυσης 24min) μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.

**Πίνακας 4.6.1.4.3. Περιγραφική Ανάλυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κλάσματος πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος Νο8 (χρόνος έκλυσης 24min) μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.**

Ομάδα	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος	13	,46131	,077601	,021523	,41441	,50820	,339	,567
Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος παρουσία Σιδήρου	13	,36323	,048942	,013574	,33366	,39281	,300	,456
Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος παρουσία Ψευδαργύρου	13	,15462	,067406	,018695	,11388	,19535	,105	,293
Total	39	,32638	,144495	,023138	,27954	,37322	,105	,567

**Πίνακας 4.6.1.4.4. Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κλάσματος πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος Νο8 (χρόνος έκλουσης 24min) μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.**

ΑΝΑΛΥΣΗ ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,638	2	,319	73,822	,000
Within Groups	,156	36	,004		
Total	,793	38			

Από τα παραπάνω δεδομένα, προκύπτει πως η αντιοξειδωτική ικανότητα του εν λόγω κλάσματος πεπτιδίων γάλακτος (No8) δεν διαφέρει όταν προστεθεί σε αυτό Σίδηρος. Αντιθέτως, διαφέρει όταν προστίθεται σε αυτό Ψευδάργυρος. Ως εκ τούτου, η αντιοξειδωτική ικανότητα του συγκεκριμένου κλάσματος πεπτιδίων γάλακτος επηρεάζεται από την παρουσία Ψευδαργύρου, ενώ δεν επηρεάζεται από την παρουσία Σιδήρου.



Στους Πίνακες 4.6.1.4.5. και 4.6.1.4.6. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης της αντιοξειδωτικής ικανότητας για το κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος Νο13 (χρόνος έκλουσης 34min) που έχει επωαστεί 40min με τη μέθοδο FRAP.

**Πίνακας 4.6.1.4.5. Περιγραφική Ανάλυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κλάσματος πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος Νο13 (χρόνος έκλουσης 34min) μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.**

Ομάδα	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος	13	,29085	,088327	,024497	,23747	,34422	,126	,483
Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος παρουσία Σιδήρου	13	,13285	,016648	,004617	,12279	,14291	,100	,165
Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος παρουσία Ψευδαργύρου	13	,09031	,007227	,002004	,08594	,09467	,079	,101
Total	39	,17133	,101029	,016178	,13858	,20408	,079	,483

**Πίνακας 4.6.1.4.6. Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κλάσματος πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος Νο13 (χρόνος έκλουσης 34min) μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.**

ΑΝΑΛΥΣΗ ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,290	2	,145	53,552	,000
Within Groups	,098	36	,003		

ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΟΒΑ					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,290	2	,145	53,552	,000
Within Groups	,098	36	,003		
Total	,388	38			

Σύμφωνα με τα προαναφερθέντα στοιχεία η αντιοξειδωτική ικανότητα του εν λόγω κλάσματος πεπτιδίων γάλακτος (No13) διαφέρει όταν προστεθεί σε αυτό Σίδηρος ή Ψευδάργυρος.

Στους Πίνακες 4.6.1.4.7. και 4.6.1.4.8. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κλάσματος πεπτιδίων γάλακτος No20 (χρόνος έκλουσης 48min), που έχει επωαστεί 40min με τη μέθοδο FRAP.

**Πίνακας 4.6.1.4.7. Περιγραφική Ανάλυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κλάσματος πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος No20 (χρόνος έκλουσης 48min) μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.**

Ομάδα	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος	13	,23185	,045330	,012572	,20445	,25924	,185	,326
Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος παρουσία Σιδήρου	13	,11354	,018351	,005090	,10245	,12463	,071	,142
Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος παρουσία Ψευδαργύρου	13	,08562	,005316	,001474	,08240	,08883	,076	,097

Ομάδα	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος	13	,23185	,045330	,012572	,20445	,25924	,185	,326
Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος παρουσία Σιδήρου	13	,11354	,018351	,005090	,10245	,12463	,071	,142
Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος παρουσία Ψευδαργύρου	13	,08562	,005316	,001474	,08240	,08883	,076	,097
Total	39	,14367	,069912	,011195	,12100	,16633	,071	,326

Πίνακας 4.6.1.4.8. Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κλάσματος πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος No20 (χρόνος έκλουσης 48min) μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP.

ΑΝΑΛΥΣΗ ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,157	2	,078	97,130	,000
Within Groups	,029	36	,001		
Total	,186	38			

Βάσει των παραπάνω, προκύπτει πως η αντιοξειδωτική ικανότητα του εν λόγω κλάσματος πεπτιδίων γάλακτος (No20) διαφέρει όταν προστεθεί σε αυτό Σίδηρος ή Ψευδάργυρος.

**Πίνακας 3.6.1.4.9. Συγκεντρωτικός Πίνακας Ανάλυσης Σημαντικότητας  $\gamma$  της αντιοξειδωτικής ικανότητας κλασμάτων πεπτιδίων αγελαδινού γάλακτος μετά από επώαση 40min με τη μέθοδο Frap.**

<b>Ομάδες</b>	<b>Σημαντικότητα</b>
<b>Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος No7 (χρόνος έκλυσης 22min)</b>	a
<b>Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος No7 (χρόνος έκλυσης 22min) παρουσία Σιδήρου</b>	b
<b>Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος No7 (χρόνος έκλυσης 22min) παρουσία Ψευδαργύρου</b>	c
<b>Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος No8 (χρόνος έκλυσης 24min)</b>	
<b>Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος No8 (χρόνος έκλυσης 24min) παρουσία Σιδήρου</b>	a
<b>Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος No8 (χρόνος έκλυσης 24min) παρουσία Ψευδαργύρου</b>	b
<b>Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος No13 (χρόνος έκλυσης 34min)</b>	
<b>Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος No13 (χρόνος έκλυσης 34min) παρουσία Σιδήρου</b>	b
<b>Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος No13 (χρόνος έκλυσης 34min) παρουσία Ψευδαργύρου</b>	b
<b>Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος No20 (χρόνος έκλυσης 48min)</b>	
<b>Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος No20 (χρόνος έκλυσης 48min) παρουσία Σιδήρου</b>	b
<b>Κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος No20 (χρόνος έκλυσης 48min) παρουσία Ψευδαργύρου</b>	b

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 5.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΙΔΗΡΟΥ ΚΑΙ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕ ΥΨΗΛΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΙΣΧΥΡΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΣΙΔΗΡΟΥ

Από την πειραματική αυτή μελέτη μπορούν να εξαχθούν τα κάτωθι συμπεράσματα:

- Κλάσματα πεπτιδίων με MB 1000 έως 5000 προερχόμενα από αγελαδινό γάλα που έχει υποστεί ενζυμική υδρόλυση, παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ικανότητες. Με την αύξηση του χρόνου επώασης παρατηρήθηκε αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος. Η υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα παρουσιάστηκε έπειτα από επώαση 40min με τη μέθοδο FRAP σε όλα τα πεπτιδικά κλάσματα.
- Συγκριτικά με την αντιοξειδωτική ικανότητα ενός ισχυρού αντιοξειδωτικού όπως είναι το πράσινο τσάι, η αντιοξειδωτική ικανότητα των κλασμάτων πεπτιδίων που επώαστηκαν για 10min με τη μέθοδο FRAP είναι 200 φορές μικρότερη από εκείνη του πράσινου τσαγιού στον ίδιο χρόνο επώασης με τη μέθοδο FRAP.
- Τα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος με την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, έπειτα από επώαση 40min των δειγμάτων με τη μέθοδο FRAP ήταν εκείνα που εκλούσθηκαν στα 22min (κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος No7) και στα 24min (κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος No8).
- Η παρουσία Σιδήρου και Ψευδαργύρου στα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος μείωσε την αντιοξειδωτική ικανότητα των τελευταίων. Ωστόσο, η παρουσία Σιδήρου στα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος δεν επηρέασε την αντιοξειδωτική ικανότητα του κλάσματος πεπτιδίων που εκλούσθηκε στα 24min (κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος No8) και το οποίο διέθεταν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα. Ενώ, η παρουσία Ψευδαργύρου στα κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος επηρέασε αρνητικά την αντιοξειδωτική ικανότητα όλων των κλασμάτων πεπτιδίων, συμπεριλαμβανομένων και των κλασμάτων πεπτιδίων που διέθεταν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα (κλάσμα πεπτιδίων γάλακτος No7 και No8).
- Βρέθηκαν κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος (No5 με χρόνο έκλουσης 18min και No10 με χρόνο έκλουσης 28min) που παρουσίαζαν αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα και ισχυρή επίδραση στην αύξηση της διαλυτότητας Σιδήρου. Συνεπώς, υπήρχαν κλάσματα πεπτιδίων που διέθεταν διπλές ιδιότητες. Ωστόσο, οφείλει να σημειωθεί πως τα εν λόγω πεπτιδικά κλάσματα αγελαδινού γάλακτος δεν διαθέτουν την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από το σύνολο των πεπτιδικών κλασμάτων που εξετάστηκαν. Ενώ στην περίπτωση παρουσίας Σιδήρου στα τρόφιμα στα οποία προστίθενται μειώνει σημαντικά την αντιοξειδωτική ικανότητα των πεπτιδίων καταστρώντας την ουσιαστικά ανενεργή.

Βάσει των παραπάνω συμπερασμάτων, διαπιστώθηκε η ύπαρξη αντιοξειδωτικής ικανότητας σε κλάσματα πεπτιδίων γάλακτος. Η ξένη βιβλιογραφία αναφέρει πως υπάρχουν βιοενεργά πεπτίδια γάλακτος τα οποία έχουν αντιοξειδωτικές ικανότητες και ενδεχομένως να απελευθερώνονται μέσω της ενζυματικής υδρόλυσης του γάλακτος [20]. Ωστόσο, η μικρή αντιοξειδωτική ικανότητα των κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος συγκριτικά με εκείνη ισχυρών αντιοξειδωτικών όπως το πράσινο τσάι, κατατάσσει τα βιοενεργά πεπτίδια γάλακτος μη εκμεταλλεύσιμα για τις εν λόγω μόνο ιδιότητες τους.

Αξίζει να αναφερθεί ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα των κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος δύναται να επηρεάζεται από τη χαμηλή συγκέντρωση των κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος που λαμβάνονται κατά το χρωματογραφικό διαχωρισμό και ενδεχομένως η αύξηση της συγκέντρωσης των κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος να έδινε αυξημένες τιμές αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Συνεπώς για να μπορέσουμε να χρησιμοποιήσουμε τις βιοενεργές ιδιότητες των πεπτιδικών κλασμάτων του γάλακτος στα τρόφιμα, προκειμένου να προσδώσουμε σε αυτά λειτουργικές ιδιότητες απαιτείται περαιτέρω μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κλασμάτων πεπτιδίων γάλακτος και των συνεργιστικών ή ανταγωνιστικών σχέσεων μεταξύ αμινοξέων ή κλασμάτων πεπτιδίων και άλλων αντιοξειδωτικών συστατικών ή άλλων στοιχείων όπως Σίδηρος και Ψευδάργυρος που πιθανόν να συνυπάρχουν στο τρόφιμο και να επηρεάζουν την υπάρχουσα ιδιότητα.

Επιπρόσθετα, η ύπαρξη βιοενεργών κλασμάτων πεπτιδίων που διαθέτουν και άλλες λειτουργικές ιδιότητες όπως ισχυρή επίδραση στην αύξηση της διαλυτότητας του σιδήρου, αποτελεί πολλά υποσχόμενο πεδίο και χρίζει περαιτέρω έρευνας, προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσο είναι δυνατή η παραγωγή τους και η χρήση τους σε βιομηχανική κλίμακα.

Τέλος αξίζει να σημειωθεί πως η αντιοξειδωτική δράση των πεπτιδίων γάλακτος που μελετάται *in vitro*, πρέπει να μελετηθεί και για την θετική της επίδραση στον άνθρωπο, καθώς στο άμεσο μέλλον η χρήση τους στα τρόφιμα μπορεί να προσδώσει επιπλέον λειτουργικές ιδιότητες σε αυτά, ενώ χρίζει περαιτέρω διεύρυνσης η επίδραση των διάφορων στοιχείων όπως Σίδηρος και Ψευδάργυρος που συνυπάρχουν με τα πεπτίδια εντός του τροφίμου, στην αντιοξειδωτική ικανότητα των πεπτιδίων.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] <http://www.milkfacts.info/Nutrition%20Facts/Nutritional%20Components.html>
- [2] <http://www.scientificpsychic.com/fitness/aminoacids.html>
- [3] <http://www.milkfacts.info/Milk%20Composition/Protein.html>
- [4] Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides Anne Pihlanto-Leppälä<sup>1</sup>, Trends in Food Science & Technology, Volume 11, Issues 9–10, 10 September 2000, Pages 347–356
- [5] Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests : concentration and characterization of active peptides, By ANNE PIHLANTO-LEPPÄLÄ, PASIVI KOSKINEN\*, KATI PILOLA, TUOMO TUPASELA and HANNU KORHONEN Journal of Dairy Research (2000) 67 53±64
- [6] Korhonen, H., Pihlanto-Leppälä, A., Rantama, P. & Tupasela, T. 1998 Impact of processing on the functionality of bioactive dietary proteins. Trends in Food Science and Technology 9 307- 319
- [7] Ariyoshi, Y. 1993 Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins. Trends in Food Science and Technology 4 139-144
- [8] Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N. & Suzuki, H. 1985 Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. Agricultural and Biological Chemistry 49 1405-1409
- [9] Maruyama, S. & Suzuki, H. 1982 A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. Agricultural and Biological Chemistry 46 1393-1394
- [10] Meisel, H. & Schlimme, E. 1994 Inhibitors of angiotensin converting enzyme derived from bovine casein (casokinins). In b-Casomorphins and Related Peptides: Recent developments, pp. 27±33 (Eds V. Brantl and H. Teschemacher). New York: VCH Weinheim
- [11] Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S. & Takano, T. 1995a Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. Journal of Dairy Science 78 777-783
- [12] Maeno, M., Yamamoto, N. & Takano, T. 1996 Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from Lactobacillus helveticus CP790. Journal of Dairy Science 79 1316-1321
- [13] Mullally, M. M., Meisel, H. & FitzGerald, R. J. 1996 Synthetic peptides corresponding to a-lactalbumin and b-lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. Biological Chemistry Hoppe-Seyler 377 259-260
- [14] Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T. & Korhonen, H. 1998 Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. International Dairy Journal 8 325±331

- [15] Brantl, V., Teschemacher, H., Blasig, J., Henschen, A. & Lottspeich, F. 1981 Opioid activities of b-casomorphins. *Life Sciences* 28 1903-1909
- [16] Antila, P., Paakkari, I., Jašvinen, A., Mattila, M. J., Laukkanen, M., Pihlanto-Leppala, A., Mantsala, P. & Hellman, J. 1991 Opioid peptides derived from in vitro proteolysis of bovine whey proteins *International Dairy Journal* 1 215-229
- [17] Mullally, M. M., Meisel, H. & FitzGerald, R. J. 1997a Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine b-lactoglobulin. *FEBS Letters* 402 99-101
- [18] <http://www.dairyscience.info/exploitation-of-anti-microbial-proteins/111-milk-protein-derived-bioactive-peptides.html>
- [19] FitzGerald, R. J. and Meisel, H. (2000). Milk protein derived inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *British Journal of Nutrition* 84:S33–S37.
- [20] Korhonen, H., and Pihlanto-Leppälä, A. (2001). Milk protein-derived bioactive peptides—novel opportunities for health promotion. *IDF Bulletin* 363:17–26.
- [21] Meisel, H. and FitzGerald, R. J. (2003) Biofunctional peptides from milk proteins. Mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design* 9:1289–1295.
- [22] Migliore-Samour, D., Floch, F. and Jollés, P. (1989). Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation. *Journal of Dairy Research* 56:357–362.
- [23] Meisel, H. (1998). Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal* 8:363–373.
- [24] Korhonen, H. and Pihlanto, A. (2001). Food-derived bioactive peptides—opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design* 9:1297–1308.
- [25] Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K. and Tomita, M. (1992). Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1121:130–136.
- [26] Smacchi, E. and Gobetti, M. (1998). Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme. *Enzyme and microbial technology*. 22:687–694.
- [27] Nagaoka, S., Futamura, Y., Miwa, K., Awano, T., Yamauchi, K. and Kanamaru, Y. (2001). Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β-lactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 218:11–17.
- [28] Bioactive milk peptides: a prospectus. *J Dairy Sci.* 2000 Jun;83(6):1187-95. Clare DA, Swaisgood HE.
- [29] Review: Production and functionality of active peptides from milk. Muro Urista C, Álvarez Fernández R, Riera Rodríguez F, Arana Cuenca A, Téllez Jurado A. *Food Science and Technology Int.* 2011 Aug;17(4):293-317.
- [30] Peptides from milk proteins and their properties Kilara A, Panyam D. *Crit Rev Food Science and Nutrition.* 2003;43(6):607-33.



- [31] Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey Protein E Aida Pen~ a-Ramos,1 Youling L Xiong and Guillermo E Arteaga Journal of the Science of Food and Agriculture 84:1908–1918 (online: 2004) DOI: 10.1002/jsfa.1886
- [32] Tong LM, Sasaki S, Mc Clements DJ and Decker EA, Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. Journal of Agriculture and Food Chemistry 48:1473–1478 (2000)
- [33] Tong LM, Sasaki S, McClements DJ and Decker EA, Antioxidant activity of whey in a salmon oil emulsion. Journal Food Science 65:1325–1329 (2000).
- [34] Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F and Nokihara K, Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidant peptide isolated from digests of a soybean protein. Journal Agric Food Chem 44:2619–2623 (1996).
- [35] Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Fujimoto K and Nokihara K, Antioxidant properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. Journal Agric Food Chem 46:49–53 (1998)
- [36] Karel M, Tannenbaum SR, Wallace DH and Maloney H, Antioxidation of methyl linoleate in freeze-dried model systems. III. Effects of added amino acids. Journal Food Sci 31:892–896 (1966).
- [37] Jung MY, Kim SK and Kim SY, Riboflavin-sensitized photooxidation of ascorbic acid: kinetics and amino acid effects. Food Chem 53:397–403 (1995).
- [38] Antioxidative peptides derived from milk proteins Anne Pihlanto\_ International Dairy Journal 16 (2006) 1306–1314
- [39] [Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance Xinyan Peng<sup>a</sup>, Youling L. Xiong<sup>c</sup>, Baohua Kong<sup>a</sup>
- [40] Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey Protein E Aida Pena-Ramos, ~Youling L Xiong and Guillermo E Arteaga 2004 Society of Chemical Industry
- [41] Riboflavin-sensitized photooxidation of ascorbic acid: Kinetics and amino acid effects. Jung, M. Y., Kim, S. K., & Kim, S. Y. (1995). Food Chemistry, 53, 397–403.
- [42] Marcuse, R. (1960). Antioxidant effect of amino acids. Nature, 186, 886–887.
- [43] Effects of meat and selected food components on the valence of nonheme iron during in vitro digestion. Kapsokefalou, M., Miller, D.D. 1991. Journal of Food Science 56:352-355&358.
- [44] B.J.S.C. Olson and J. Markwell (2007) Assay of protein concentration. Curr. Protocol. Prot. Sci., 3.4.1-3.4.29.
- [45] The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. Benzie I.F. & Strain J.Z., 1996. Analytical Biochemistry, 239(1),70-76.

- [46] Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. Katalinic, V., Milos, Kulsic T., & Jukic M. Food Chemistry, 94 (4), 550-557.
- [47] Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by ‘ferric reducing antioxidant power’ assay and cyclic voltametry. Firuzi., O., Lacanna A, Petrucci, R. Marrosu, G., & Saso L. 2005. Biochimica and Biophysica Acta, 1721, 174-184
- [48] Adding iron to green tea modifies the antioxidant capacity in rats. Kapsokefalou, M, Zhu L, & Miller, D.D. 2006. Nutrition Research, 26(9), 480-485.